

# **Interaktion von *Listeria monocytogenes* mit dem humanen Immunsystem**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von Roland Grenningloh  
aus Münster

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Prof. Dr. T. Chakraborty

eingereicht am: 15.07.99

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.11.99

2000

## **Vorabveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor / die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Grenningloh, R., A. Darji, J. Wehland, T. Chakraborty & S. Weiss.

Listeriolysin and IrpA are major protein targets for the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 65(9):3976-3980

## **Tagungsbeiträge**

Grenningloh, R., G. Casorati, P. Dellabona & S. Weiss.

Induction of antigen-specific as well as autoreactive, CD1-restricted CD4<sup>+</sup>/8<sup>-</sup> T cells by dendritic cells. (Poster und Vortrag) XXVIII. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Würzburg (1997)

Grenningloh, R., K. E. J. Dittmar, M. Rohde, J. Wehland, T. Chakraborty & S. Weiss.

Human dendritic cells are insensitive to the immuno-inhibitory effects conferred by the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. (Poster und Vortrag) XXIX. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Freiburg (1998)

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, in der Abteilung Zellbiologie und Immunbiologie, Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie, angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Wehland für die Vertretung dieser Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät und die Übernahme des Hauptreferats. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. N. Käufer und Herrn Prof. Dr. T. Chakraborty für ihre Bereitschaft, als Prüfer zur Verfügung zu stehen. Herrn Prof. Chakraborty danke ich darüberhinaus vor allem für sein ständiges Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit, für viele nützliche Anregungen und natürlich nicht zuletzt für teilweises finanzielles Sponsoring.

Herr Dr. Siegfried Weiß gab mir die Möglichkeit, auf einem interessanten Gebiet der Immunologie zu arbeiten. Dabei hielt er ständig Vorschläge und Anregungen bereit und verbreitete, wenn nötig, Optimismus. Vor allem aber danke ich ihm dafür, mich für ein paar Monate an ein anderes Labor ausgeliehen zu haben, wobei meine Arbeit um die geheimnisvolle Welt der DN T-Zellen erweitert wurde. Die Zusammenarbeit mit Dr. Giulia Casorati und Dr. Paolo Dellabona kam maßgeblich auf seine Initiative hin zustande. Diesen beiden und ihren Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor in Mailand. Der Aufenthalt in Italien wurde größtenteils durch den DAAD finanziert. Eine lohnende Investition.

Herrn Dr. K. Dittmar und Herr Dr. M. Rohde gilt mein Dank für die mikroskopischen Aufnahmen.

Allen (Ex-)Molis herzlichen Dank für das tolle Arbeitsklima, gute Laune, Weihnachtessen, Kuchen und überhaupt alles. Ich würde gern alles einzeln aufzählen, aber dafür reicht der Platz nicht (und außerdem muß ich in 5 Minuten abgeben).

Es war eine schöne Zeit.



ICH HABE FERTIG!



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das angeborene Immunsystem	2
1.2	Das adaptive Immunsystem	4
1.2.1	B-Lymphozyten	5
1.2.2	T-Lymphozyten	7
1.2.2.1	Konventionelle T-Zellen	8
1.2.2.2	Nicht-konventionelle T-Zellen	11
1.3	Antigen-Präsentation	16
1.3.1	Struktur von MHC- und MHC-ähnlichen Molekülen	16
1.3.2	MHC Klasse I-abhängige Antigen-Präsentation	19
1.3.3	MHC Klasse II-abhängige Antigen-Präsentation	21
1.3.4	Antigen-Präsentation durch CD1	23
1.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	25
1.4.1	Infektionszyklus und Virulenzfaktoren	25
1.4.2	Infektionsverlauf und Immunantwort	27
1.4.3	Beeinflussung der T-Helfer-Antwort durch <i>L. monocytogenes</i>	31
1.5	Zielsetzungen der Arbeit	32
1.5.1	Die spezifische humorale Immunantwort	32
1.5.2	Inhibition der MHC II-abhängigen T-Zell-Stimulierung	33
1.5.3	Stimulation CD1-restringierter DN T-Zellen durch Listerien	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1	Allgemeines	34
2.2	Seren	34
2.3	Antikörper	34
2.3.1	Sekundäre Antikörper für Immunoblot und ELISA	34
2.3.2	Primäre Antikörper für Immunoblot und ELISA	35
2.3.3	Antikörper für Zytofluorimetrie und Auftrennung von Zellen	35
2.4	Antigene für Immunoblot und ELISA	36
2.4.1	Präparation listerieller Zellwand- und Überstandsproteine	36
2.5	Immunoblots	37
2.5.1	NBT/BCIP-Färbung	37
2.6	Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)	38
2.6.1	Sandwich-ELISA	38

2.7	Bestimmung von Protein-Konzentrationen	39
2.8	Silberfärbung von Proteingelen	39
2.9	Listerien-Stämme	39
2.10	Hyperexpression, Reinigung und Charakterisierung von p60	40
2.10.1	Konstruktion von p60-Hyperexpressionsstämmen	40
2.10.2	Reinigung von p60	41
2.10.3	Proteinsequenzanalyse	42
2.10.4	Messung der lytischen Aktivität von p60	42
2.11	Zellkultur	43
2.11.1	Medien, Zusätze, Antigene	43
2.11.2	Zellen	43
2.11.3	Isolierung verschiedener Zelltypen aus humanem Blut	44
2.11.4	Isolierung spezifischer humaner CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone	44
2.11.5	Benutzte CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone	45
2.11.6	Etablierung von CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (DN) T-Zelllinien und -Klonen	45
2.11.7	Herstellung EBV-transformierter B-Zellen	46
2.12	Zelluläre Tests	47
2.12.1	Proliferationstest	47
2.12.2	<sup>51</sup> Cr-Zytotoxizitätstest	47
2.12.2.1	JAM-Test	48
2.12.3	Inhibitionstest mit gereinigtem LLO	49
2.12.4	Messung der TcR-Internalisierung	49
2.12.5	“Limiting Dilution Analysis”	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	Die spezifische humorale Immunantwort gegen Protein-antigene von <i>Listeria monocytogenes</i>	51
3.1.1	Quantifizierung der spezifischen humoralen Immunantwort	54
3.1.2	Analyse der Antikörperantwort in Listeriose-Patienten	57
3.2	Frequenz <i>L. monocytogenes</i> -spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Blut gesunder Spender	58
3.3	Reinigung und Charakterisierung von p60	60
3.3.1	Bestimmung der Ausbeute	62
3.3.2	Enzymatische Aktivität des gereinigten p60	63

3.4	Inhibition der MHC II-abhängigen T-Zell-Stimulierung	64
3.4.1	LLO beeinträchtigt die CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch PBMC	64
3.4.2	Verschiedene APC reagieren unterschiedlich sensitiv auf LLO	65
3.4.3	Die Störung der T-Zell-Stimulation durch LLO beruht in Mensch und Maus auf unterschiedlichen Mechanismen	69
3.5	Infektion dendritischer Zellen mit <i>L. monocytogenes</i>	75
3.6	Stimulation CD1-restringierter CD4/CD8 doppelt-negativer (DN) T-Zellen durch <i>Listeria monocytogenes</i>	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	88
4.1	Die spezifische humorale Immunantwort	88
4.2	Inhibition der MHCII-abhängigen T-Zell-Stimulierung	91
4.2.1	Infektion dendritischer Zellen mit <i>L. monocytogenes</i>	94
4.3	Stimulation CD1-restringierter DN T-Zellen durch <i>Listeria monocytogenes</i>	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	100
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	102
6.1	Abkürzungen	102
6.2	Literatur	103



# 1 Einleitung

Im allgemeinen laufen die verschiedenen physiologischen Reaktionen, die zur Erhaltung des Körpers nötig sind, in deutlich abgegrenzten Funktionseinheiten, den Organen, ab. Daneben existiert aber in höheren Vertebraten ein System von Zellen und Organen, das trotz der räumlichen Trennung seiner einzelnen Komponenten eine funktionelle Einheit bildet: das Immunsystem. Es besteht aus scheinbar isoliert agierenden verschiedenen Zelltypen, die jedoch in der Lage sind, miteinander zu kommunizieren und eine koordinierte Abwehr gegen eingedrungene Pathogene einzuleiten, sowie entartete körpereigene Zellen zu beseitigen. Die grundlegende Leistung des Immunsystems besteht dabei in der Unterscheidung zwischen körpereigenen Strukturen ("Selbst"), die toleriert werden, und körperfremden Strukturen ("Nicht-Selbst"), die als potentiell gefährlich erkannt werden und eine Immunantwort auslösen.

Es existieren zwei Zweige des Immunsystems: das phylogenetisch ältere, *angeborene Immunsystem* umfaßt relativ unspezifische Abwehrmechanismen, die bereits beim ersten Eindringen eines Pathogenes zum Tragen kommen. Eine erneute Infektion mit demselben Erreger hat keine verbesserte Abwehr durch Komponenten des angeborenen Immunsystems zur Folge. Hingegen zeichnet sich das *adaptive Immunsystem* durch hohe Spezifität, "Lernfähigkeit" und ein "Gedächtnis" aus. Die adaptive Immunantwort zeigt im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort erst mit einiger Verzögerung nach Eindringen eines Pathogenes einen Effekt. Im Verlauf der Infektion wird die Qualität der adaptiven Immunantwort immer weiter erhöht. Bei einer wiederholten Infektion mit demselben Pathogen reagiert deshalb das adaptive Immunsystem schneller und besser als bei der ersten Infektion. Das phylogenetisch jüngere, adaptive Immunsystem der höheren Vertebraten ersetzt dabei aber nicht die angeborene Immunantwort; vielmehr arbeiten die Komponenten beider Zweige bei der Immunabwehr eng zusammen.

Krankheitserreger lassen sich in 5 Gruppen unterteilen: Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Würmer (1). Diese haben unterschiedlichste Strategien entwickelt, um die Immunabwehr zu durchbrechen. Viren dringen in Zellen ein und nutzen deren Maschinerie zur Vermehrung. Größere Pathogene wie z.B. Pilze oder Helminthen vermehren sich in den Interstitien, der Lymphe oder im Blut. Pathogene Bakterien haben wohl die größte Vielfalt entwickelt beim Versuch, die Abwehrmechanismen des Immunsystems zu unterlaufen. Neben Spezies, die sich auf die Besiedelung von Epithelien spezialisiert haben, existieren andere, die in den Körper eindringen. Diese wiederum lassen sich in extra- und intrazelluläre Erreger unterteilen.

Neben der Abwehr externer Pathogene ist die zweite Hauptaufgabe des Immunsystems die Erkennung und Vernichtung entarteter körpereigener Zellen, die wiederum spontan oder teilweise nach Infektion mit bestimmten Viren auftreten können. Wie kompliziert dabei die Unterscheidung zwischen “Selbst” und “Nicht-Selbst” bzw. zwischen harmlosen und potentiell gefährlichen Situationen ist, zeigt sich bei Überreaktionen der Immunantwort. Diese sind die Ursache für Autoimmunerkrankungen und allergische Reaktionen. Schließlich ist das Immunsystem auch für die Abstoßungsreaktion bei Gewebe-Transplantationen verantwortlich. Der folgende Teil soll sich nur auf die grundlegenden Funktionen des Immunsystems bei der Abwehr bakterieller Pathogene beschränken.

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Die meisten Mikroorganismen werden bereits durch mechanische und physiologische Barrieren, die nicht Teil des Immunsystems im eigentlichen Sinne sind, am Eindringen in den Körper gehindert. Haut, Darm- und Lungenepithel können von Mikroorganismen im allgemeinen nicht durchdrungen werden. Zusätzlich bietet z.B. die Magensäure einen effektiven Schutz gegen die meisten mit der Nahrung aufgenommen Keime, während das in Nasensekret und Tränenflüssigkeit enthaltene Lysozym z.B. Gram-negative Bakterien direkt abtötet. Erreger, welche die Barriere des Epithels überwinden, werden zum größten Teil durch Komplement sowie durch Zellen des angeborenen Immunsystems abgetötet.

Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von Proenzymen im Serum, die sich an Mikroorganismen anlagern und dabei kaskadenartig wechselseitig aktivieren, was schließlich zur Bildung eines Membran-Angriffskomplexes und zur Lyse sensitiver Bakterien und einiger Viren führt (2). Man unterscheidet den *klassischen*, den *Lektin-induzierten* und den *alternativen* Weg der Komplementkaskade. Der klassische Weg ist einer der Knotenpunkte zwischen angeborener und adaptiver Immunität und wird durch die Bindung von Antikörpern an Mikroorganismen eingeleitet, während dies beim Lektin-induzierten Weg durch die Bindung eines Lektins an Mannose-Seitenketten auf bestimmten Bakterien und Viren geschieht. Da der klassische Weg nur durch spezifische Antikörper aktiviert wird, tritt er bei einer Erstinfektion erst mit einigen Tagen Verzögerung auf. Der alternative Weg hingegen wird durch spontane Anlagerung eines Komplement-Faktors (C3b) an Oberflächen von Pathogenen induziert. Nach der Anlagerung des Faktors C3b laufen alle drei Wege der Kaskade zur Ausbildung eines Membranangriffskomplexes gleichartig ab. Durch die Beladung mit Komplement-Proteinen werden Pathogene “opsoniert”, was deren Aufnahme durch Effektorzellen des angeborenen Immunsystems erleichtert. Diese werden außerdem durch Komplement-Spaltprodukte chemotaktisch angelockt. C3b kann sich auch spontan an körpereigene Zellen anlagern. Diese besitzen jedoch verschiedene Oberflächenproteine (CD46, CD55, CD59), die an C3b binden und so die weiteren



Schritte der Kaskade unterbinden. Auf diese Weise findet bereits im angeborenen Immunsystem eine Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst statt.

Bei den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems handelt es sich hauptsächlich um mononukleäre Phagozyten und um Granulozyten. Bei den letzteren werden drei Zelltypen unterschieden. Neutrophile phagozytieren Mikroorganismen, während Basophile und Eosinophile größere, extrazelluläre Parasiten durch Ausschüttung toxischer Effektormoleküle abtöten. Zu den mononukleären Phagozyten gehören Gewebe-Makrophagen und Monozyten, die sich im Blut aufhalten. Beide besitzen phagozytische Aktivität und können aufgenommene Mikroorganismen abtöten, besonders wenn sie zuvor durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aktiviert wurden (3). Zu den toxischen Mechanismen zählen die Ansäuerung des Phagosoms, die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen sowie der Entzug von Eisen. Monozyten, Makrophagen und Neutrophile besitzen verschiedene Oberflächenrezeptoren, die entweder direkt an Mikroorganismen binden oder auf diesen Bestandteile des Komplements erkennen. Zusätzlich exprimieren diese Zellen Rezeptoren für unterschiedliche Immunglobulin-Klassen, welche die Phagozytose erleichtern und die Zellen aktivieren. Sie stellen somit eine weitere Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar (4).

Einige Pathogene nutzen nicht aktivierte Makrophagen als Wirtszellen. Manche, wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Leishmania major*, überleben im Phagosom, indem sie dessen Fusion mit Lysosomen und die nachfolgende Ansäuerung des Milieus verhindern. Die Expression von Katalase und Superoxid-Dismutase ermöglicht einigen Pathogenen außerdem die Inaktivierung reaktiver Sauerstoff-Verbindungen in den Phagosomen. Andere (*Listeria monocytogenes*, *Trypanosoma cruzi*) entkommen aus dem Phagosom ins Zytosol (1, 5). Durch ihre doppelte Rolle als Freßzellen sowie Habitat für Pathogene sind Makrophagen ein wichtiger Verbindungspunkt zum adaptiven Immunsystem. Sie wandern in die Lymphknoten ein und präsentieren dort T- und B-Lymphozyten Fragmente abgebauter Fremdproteine. Somit gehören sie zu den wichtigen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, welche die spezifische zelluläre Immunantwort stimulieren. Eine ähnliche Funktion wird von Dendritischen Zellen ausgeübt. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Aufnahme löslichen Antigens sowie ganzer Mikroorganismen und der nachfolgenden Stimulation von T- und B-Lymphozyten in den Lymphknoten sowie der Milz; sie besitzen jedoch kaum toxische Aktivität. Solche Dendritischen Zellen entstammen derselben myeloiden Entwicklungsreihe wie Makrophagen. *In vitro* können sie, unter dem Einfluß von GM-CSF und IL-4, aus Blut-Monozyten oder direkt aus CD34-positiven Stammzellen ausdifferenzieren (6). Es existieren noch zwei weitere Gruppen dendritischer Zellen. Die eine entstammt vermutlich der lymphoiden Entwicklungsreihe und somit denselben Vorläufern wie T- und B-Lymphozyten. Sie findet sich im Thymus und spielt dort eine Rolle bei der T-Zell-Reifung, hat aber anscheinend keine direkte Funktion in der Immunantwort gegen Pathogene (7). Follikuläre dendritische

Zellen findet man ausschließlich in Lymphknoten. Sie spielen dort eine Rolle bei der Stimulation von B-Zellen. Ihre Herkunft ist unklar (8).

Eine weitere Gruppe von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Bei ihnen handelt es sich um lymphoide Zellen, die ursprünglich aufgrund ihrer Eigenschaft, bestimmte Tumor-Zellen ohne vorherigen Antigen-Kontakt abtöten zu können, beschrieben wurden. In diesem Fall registrieren NK-Zellen das Fehlen von MHC I-Molekülen, die von vielen Tumorzellen nicht exprimiert werden (9, 10). Außerdem besitzen NK-Zellen Rezeptoren für Immunglobuline und können opsonierte Zielzellen spezifisch lysieren. In letzter Zeit hat sich herausgestellt, daß sie unter anderem eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene spielen (11) (S. 27).

## 1.2 Das adaptive Immunsystem

Wenn eingedrungene Erreger nicht sofort durch das angeborene Immunsystem neutralisiert werden können, setzt die adaptive Immunantwort ein. Sie besitzt zwei Hauptmerkmale, *Spezifität* und *Gedächtnis*. Die Spezifität wird durch Antigenrezeptoren auf B- und T-Lymphozyten vermittelt. Jede dieser Zellen trägt nur Rezeptoren mit einer bestimmten Spezifität und erkennt daher nur ein bestimmtes Antigen. Das "Gedächtnis" erlaubt eine schnellere Antwort des adaptiven Immunsystems bei wiederholter Infektion mit demselben Pathogen. Es beruht darauf, daß spezifische T- und B-Zellen während der Immunantwort expandiert werden und ein Teil von ihnen in langlebige "Memory"-Zellen differenziert. Zum einen führt dies zu einer erhöhten Frequenz spezifischer Zellen, zum anderen können solche Gedächtniszellen schneller aktiviert werden (12).

T- und B-Lymphozyten erkennen Antigene auf grundlegend verschiedene Weise. Der Antigenrezeptor auf B-Zellen bindet natives Antigen in löslicher Form. Hierbei kann es sich um Proteine, Polysaccharide oder Lipide handeln (13). T-Zellen hingegen erkennen nur prozessierte Antigen-Fragmente, geladen auf MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex), auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen (14). Die Spezifität der Antigen-Rezeptoren beider Zelltypen ist bereits vor dem ersten Antigen-Kontakt festgelegt (4). Theoretisch kann für jede antigene Struktur ein passender Rezeptor gebildet werden. Diese Vielfalt wird durch Rekombinationsprozesse während der Reifung der Zellen erreicht. Welche Strukturen körpereigen sind und toleriert werden, und welche als fremd eingestuft werden und eine Immunantwort auslösen, muß vom adaptiven Immunsystem erst erlernt werden. Die meisten selbstreaktiven T-Zellen werden im Verlauf ihrer Entwicklung im Thymus eliminiert (15). Bei B-Zellen geschieht dies im Knochenmark (16). Toleranz-Induktion und -Aufrechterhaltung finden auch in

peripheren lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten statt, sind aber dort bisher nur unvollständig verstanden.

### 1.2.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind für die spezifische humorale Immunität verantwortlich. Sie werden aus Stammzellen im Knochenmark gebildet und durchlaufen dort ihre Reifung, während der auch ihre Spezifität festgelegt wird. Dies geschieht durch somatische Rekombination verschiedener Gensegmente (17). Die Antigen-bindende Region eines Antikörpers setzt sich aus sogenannten V-, D- und J-Segmenten zusammen (D-Segmente existieren nur in der schweren Kette), von denen wiederum auf DNA-Ebene mehrere Kopien (z.B. im humanen Locus der schweren Kette 51 V-, 27 D- und 6 J-Segmente (18)) existieren. Durch zufällige Rekombination wird die Antikörpervielfalt erzeugt, die durch gewisse Ungenauigkeiten beim Zusammenfügen der Segmente noch gesteigert wird. Nach Abschluß der Rekombinations-Vorgänge exprimieren die unreifen B-Zellen membranständiges IgM. Zellen, deren Antigen-Rezeptor körpereigene Strukturen erkennt, werden noch im Knochenmark deletiert (bei repetitiven Antigenen wie z.B. Oberflächenstrukturen) oder anergisiert (bei löslichen Antigenen). Die überlebenden, reifen Zellen tragen membranständiges IgM und IgD, da durch alternatives Spleißen auf mRNA-Ebene die rekombinierten V(D)J-Segmente mit den konstanten  $C_{\mu}$ - oder  $C_{\delta}$ -Segmenten verknüpft werden. Diese konstanten Regionen bestimmen die Immunglobulin-Klasse. Die reifen Zellen verlassen das Knochenmark und zirkulieren einige Tag mit Blut und Lymphe durch den Körper, bevor sie wieder absterben oder durch Erkennung "ihres" Antigens aktiviert werden (4).

Die durch B-Lymphozyten erkannten Antigene können in zwei Kategorien unterteilt werden. Sogenannte *thymusunabhängige Antigene* sind in der Lage, B-Zellen direkt zu stimulieren. Bei ihnen handelt es sich meist um hochrepetitive Antigene, wie z.B. polymere Kohlenhydrate, Lipopolysaccharide oder polymere Proteine wie Flagellin. Das Vorhandensein repetitiver Epitope führt zu einer Kreuzvernetzung der membranständigen B-Zell-Rezeptoren, wodurch diese Zellen aktiviert werden. Sie beginnen lösliches IgM zu sezernieren. Auf diese Weise aktivierte B-Lymphozyten führen keinen Ig-Klassenwechsel durch und tragen nicht zur Bildung des immunologischen Gedächtnisses bei. Jedoch antworten sie sehr schnell auf bakterielle Antigene (19, 20).

*Thymusabhängige Antigene* (z.B. lösliche Proteine) sind allein nicht in der Lage, B-Zellen zu stimulieren. Dazu werden zusätzliche Signale benötigt, welche von T-Helfer-Zellen stammen (21). Das durch den B-Zell-Rezeptor gebundene Antigen wird durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und in endosomalen Kompartimenten zu Peptiden abgebaut. Diese werden zum Teil auf

MHC Klasse II-Moleküle geladen, welche dann an die Oberfläche transportiert werden. Zur vollständigen Aktivierung der B-Zelle muß das so präsentierte Antigen von einer T-Zelle erkannt werden, die wiederum die B-Zelle durch die Interaktion von CD40/CD40L und die Ausschüttung von Zytokinen zur Proliferation (klonale Expansion) anregt (22). Diese Vorgänge finden in den Keimzentren lymphatischer Organe (Lymphknoten, Milz, Peyer'sche Plaques) statt (23, 24). Dort erfolgt auch, wiederum mit T-Zell-Hilfe und unter Beteiligung follikulärer dendritischer Zellen, die Erhöhung der Antikörper-Spezifität durch somatische Hypermutation des rekombinierten V(D)J-Segments sowie der Ig-Klassenwechsel (25). Bei letzterem werden auf DNA-Ebene die V(D)J-Segmente nacheinander an die C-Segmente angehängt, welche die Ig-Klassen bestimmen. Die B-Zelle kann so nacheinander IgM, IgD, IgG, IgA und schließlich IgE produzieren, behält aber ihre Antigen-Spezifität (26). Dieser Vorgang ist irreversibel. Bei der somatischen Hypermutation werden Punktmutationen in die V(D)J-Region eingeführt. Dabei werden solche B-Zellen positiv selektioniert, welche das Antigen, präsentiert durch die follikulären dendritischen Zellen, mit erhöhter Affinität binden. Auf diese Weise wird die Antigen-Spezifität verbessert.

Die überlebenden B-Zellen verlassen die Keimzentren und differenzieren entweder in Plasma- oder Gedächtniszellen aus, wobei unbekannt ist, welche Faktoren über diese Differenzierung entscheiden. Plasmazellen sezernieren hohe Mengen löslicher Immunglobuline, wobei das Umschalten von membranständigen auf sezernierte Immunglobuline wiederum durch differentielles Spleißen auf mRNA-Ebene erreicht wird. Sie exprimieren keine membranständigen B-Zell-Rezeptoren und kein MHC II. Daher werden sie nicht mehr durch lösliches Antigen oder T-Zellen beeinflusst. Vielmehr werden diese Zellen durch ihre kurze Lebensdauer "kontrolliert". Ein Teil der die Keimzentren verlassenden B-Zellen differenziert hingegen zu Gedächtniszellen aus. Diese sezernieren keine Antikörper und sind sehr langlebig. Bei erneutem Antigen-Kontakt können sie sehr schnell durch Wechselwirkung mit T-Helfer-Zellen aktiviert werden (4, 27).

Antikörper üben bei Infektionen mehrere Funktionen aus. Die wichtigsten sind Aktivierung der Komplement-Kaskade, Opsonierung sowie die Neutralisierung von Viren, Toxinen und Bakterien (4). Dabei verhindert die Bindung von Antikörpern das Andocken an spezifische Rezeptoren bzw., bei Bakterien, die Adhärenz an Epithelien (28). Die verschiedenen Immunglobulin-Klassen nehmen dabei unterschiedliche Funktionen wahr und differieren in ihrer Gewebeverteilung (4). IgM findet sich hauptsächlich im Blut und aktiviert das Komplement-System. Dieselbe Aufgabe übernimmt IgG, das aber darüber hinaus auch in interstitiellen Zwischenräumen vorkommt und neutralisierende sowie opsonierende Funktionen hat. Opsonierte Pathogene werden verstärkt von Granulozyten und Makrophagen aufgenommen und abgetötet. IgA dient wie IgG der Neutralisierung, wird aber über Epithelien transportiert und wirkt hauptsächlich im Darmlumen sowie in der Lunge und den Schleim-

häuten. IgE schließlich kommt subcutan und submucosal vor und aktiviert Mastzellen und Eosinophile. Diese können daraufhin größere Pathogene wie Helminthen und Schistosomen-Larven abtöten (29). Allerdings spielen diese Zellen, zusammen mit IgE, auch eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von allergischen Reaktionen (30).

### 1.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten vermitteln die spezifische zelluläre Immunantwort. Sie erkennen Antigene auf grundlegend andere Weise als B-Lymphozyten. Statt nativen Antigens bindet der T-Zell-Rezeptor (TCR; T Cell Receptor) Fragmente, geladen auf MHC-Moleküle Antigen-präsentierender Zellen (14). Bis auf wenige Ausnahmen (siehe S. 11) sind dies kurze Peptide. Strukturell ist der T-Zell-Rezeptor eng mit dem B-Zell-Rezeptor verwandt. Auch hier findet sich eine variable Region aus V-, (D)- und J-Segmenten sowie eine konstante Region (31). Die Rekombinationsvorgänge zur Erzeugung der Rezeptor-Diversität entsprechen weitgehend denen bei B-Lymphozyten. Allerdings scheint somatische Hypermutation keine zentrale Rolle bei der Generierung der T-Zell-Rezeptor-Diversität zu spielen (32). Bei den meisten T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Daneben exprimiert eine kleine Subpopulation, deren Funktion noch nicht verstanden ist, einen  $\gamma\delta$  TCR (33).

Die Reifung der T-Zellen findet hauptsächlich im Thymus statt, nachdem ihre pluripotenten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark dort eingewandert sind. Aufgrund der MHC-Restriktion durchlaufen T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus zwei Selektionsschritte. Zunächst werden solche Zellen positiv selektiert, deren TCR körpereigene MHC-Moleküle erkennt. Aus den überlebenden Vorläuferzellen werden durch negative Selektion solche ausgesondert, die körpereigene Peptide auf dem MHC-Molekül binden. Die reifen T-Zellen, die schließlich den Thymus verlassen, erkennen körperfremde Peptide auf körpereigenen MHC-Molekülen (34-37).

Diese Zellen gelangen in die Blut- und Lymphzirkulation und passieren dabei lymphatische Organe (Lymphknoten, Milz). Dort interagieren sie zunächst relativ unspezifisch mit Hilfe von Integrinen mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (38). Erkennen sie dabei auf diesen Zellen "ihr" Antigen, können sie aktiviert werden (s.u.).

Der T-Zell-Rezeptor ist auf der Zelloberfläche mit einem Komplex aus sechs Polypeptiden assoziiert, der als CD3 bezeichnet wird und der Signalweiterleitung dient (39). Außerdem exprimieren die meisten T-Zellen die Co-Rezeptoren CD4 oder CD8, welche durch Bindung an MHC II bzw. MHC I die Aktivierungsschwelle erniedrigen (40). Die Bindung eines passenden MHC/Peptid-Komplexes durch

den T-Zell-Rezeptor führt dazu, daß sich der TCR/CD3-Komplex mit CD4 oder CD8 und einer Protein-Tyrosin-Phosphatase, CD45, zusammenlagert. CD3 und CD4/8 sind mit zwei zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, fyn bzw. lck assoziiert, welche durch die Zusammenlagerung aktiviert werden. CD45 verstärkt die Aktivierung beider Kinasen. Dadurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche schließlich zur Proliferation und Differenzierung führt (41).

Die Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes reicht zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen nicht aus. Hierfür wird ein *zweites Signal* benötigt, das durch kostimulatorische Moleküle auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen vermittelt wird. Nur solche Zellen sind in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren, da nur sie sowohl das Antigen präsentieren als auch Kostimulation vermitteln. Bei den kostimulatorischen Molekülen handelt es sich um B7-1 (CD80) bzw. B7-2 (CD86), welche von Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B-Zellen exprimiert werden können. Sie binden an CD28 auf der T-Zelle, welches das positive kostimulatorische Signal weiterleitet. Dabei wird von der T-Zelle gleichzeitig ein weiterer Rezeptor, CTLA-4, hochreguliert, der mit höherer Affinität an B7 bindet, aber der T-Zelle ein negatives Signal liefert. Dadurch wird eine Kontrollfunktion ausgeübt und die T-Zell-Antwort begrenzt (42, 43).

Bei der spezifischen zellulären Immunantwort spielen verschiedene mehr oder weniger gut charakterisierte T-Zell-Populationen eine Rolle, die aufgrund der Expression verschiedener Oberflächenmarker unterschieden werden können. Die beiden am besten untersuchten Gruppen, auch als *konventionelle T-Zellen* bezeichnet, sind charakterisiert durch die Expression der Co-Rezeptoren CD4 oder CD8, zusammen mit dem  $\alpha\beta$  TCR, und üben unterschiedliche Funktionen aus. Die *nicht-konventionellen T-Zellen* sind eine sehr heterogene Gruppe und nehmen vermutlich in der frühen Phase der spezifischen Immunantwort regulatorische Funktionen wahr (siehe S.11).

### 1.2.2.1 Konventionelle T-Zellen

CD8-positive T-Zellen sind MHC I-restringiert, d.h. sie erkennen Peptide, welche an MHC I-Moleküle gebunden sind. Diese Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und präsentieren Peptide, die von zytosolischen Proteinen stammen (*endogene Peptide*). Tumor- sowie Virus-infizierte Zellen präsentieren auf ihren MHC I-Molekülen neben zelleigenen Peptiden auch solche, die von Tumor- bzw. viralen Antigenen stammen (44). Sie können dann durch für diese Antigene spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen lysiert werden. Diese werden daher als *zytotoxische T-Zellen* (CTL; cytotoxic T lymphocytes) bezeichnet. Bestimmte mikrobielle Erreger wie *Listeria monocytogenes* und *Trypanosoma cruzi* residieren ebenfalls im Zytosol ihrer Wirtszellen (45, 46). Auch hier werden infizierte Zellen durch

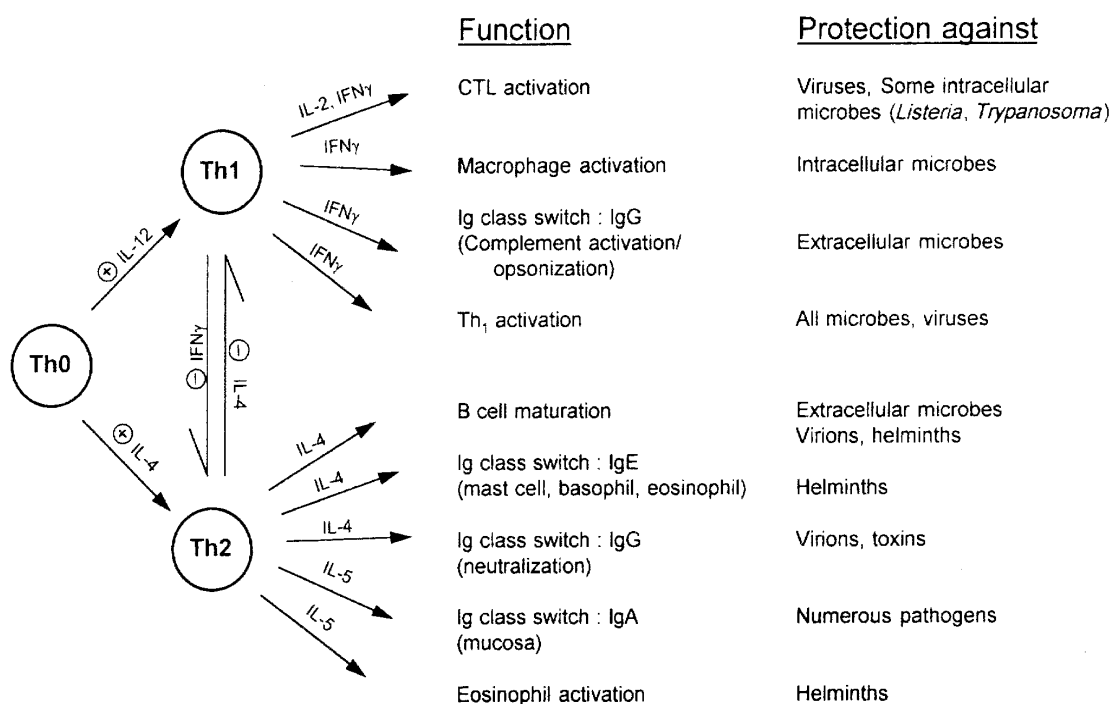
zytotoxische T-Zellen lysiert (47, 48). Aber auch Pathogene, die in den lysosomalen Kompartimenten der Wirtszelle überleben, können eine CTL-Antwort induzieren. Vermutlich werden antigene Peptide durch einen bisher unbekannten Mechanismus aus den Lysosomen in das Zytosol transportiert und gelangen so in den MHC I-Präsentationsweg (49, 50).

Zur Eliminierung infizierter Wirtszellen setzen CTL Perforin frei, das auf der Membran der Zielzelle zu einer Pore polymerisiert, welche die Zelle direkt schädigt und außerdem den Eintritt von Enzymen wie Granzymen und Granulysin ermöglicht (51). Granzyme induzieren das zelleigene Apoptose-Programm (52, 53). Das erst kürzlich beschriebene Granulysin hingegen greift nicht die Zielzelle an, sondern hat antimikrobielle Wirkung. Es wirkt toxisch auf verschiedene Bakterien, Pilze und Parasiten und ist in der Lage, *Mycobacterium tuberculosis* intrazellulär abzutöten (54). Bisher wurde Granulysin nur bei humanen CTL und NK-Zellen gefunden. CTL können Apoptose infizierter Zielzellen noch auf andere Weise induzieren. Sie exprimieren nach Aktivierung den Fas-Liganden (FasL), der an Fas auf Zielzellen bindet. Dadurch erhalten diese ein Signal, das Apoptose-Programm einzuleiten (55, 56).

CD4-positive T-Zellen sind MHC II-restringiert. MHC II-Moleküle werden nur von *professionellen Antigen-präsentierenden Zellen* wie Monozyten/Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Sie präsentieren *exogene Peptide*, welche von Proteinen oder Mikroorganismen stammen, die aus dem extrazellulären Milieu aufgenommen und in lysosomalen Kompartimenten prozessiert werden oder direkt von Pathogenen, die in solchen Kompartimenten residieren. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen werden auch als T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>) bezeichnet, da sie nach Antigen-Stimulation B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen aktivieren. Dies kann sowohl durch Ausschüttung von Zytokinen als auch über die Interaktion von CD40L auf den T-Zellen und CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen geschehen. Die Aktivierung dendritischer Zellen über CD40/CD40L führt z.B. dazu, daß diese ihrerseits naive CD8-T-Zellen aktivieren können (57).

Anhand des Spektrums der produzierten Zytokine können zwei Subpopulationen unterschieden werden, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren hauptsächlich Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-2 (IL-2), während T<sub>H</sub>2-Zellen vorwiegend IL-4, IL-5 und IL-10 ausschütten (58). Helfer-T-Zellen haben entscheidenden Einfluß auf die Art der Immunantwort nach einer Infektion (Abb. 1). T<sub>H</sub>1-Zellen werden auch als inflammatorische T-Zellen bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger (1). Da solche Mikroorganismen der humoralen Immunantwort (vermittelt durch Komplement und Antikörper) zunächst nicht zugänglich sind, werden zu ihrer Beseitigung zelluläre Mechanismen benötigt. Inflammatorische T-Zellen unterstützen die zelluläre Immunantwort durch die Aktivierung von Makrophagen (durch IFN- $\gamma$ ) und zytotoxischen T-Zellen (durch IL-2). Teilweise richtet sich die inflammatorische Antwort aber auch gegen extrazelluläre Pathogene, da z.B. IFN- $\gamma$  in der Maus

die Produktion von IgG2a und IgG3 und somit die Opsonierung von Mikroorganismen und die Aktivierung der Komplement-Kaskade induziert.  $T_H2$ -Zellen hingegen fördern vorwiegend die humorale Immunantwort. Sie setzt bei Infektionen mit extrazellulären Pathogenen ein. Durch die Produktion von IL-4 und IL-5 werden B-Zellen aktiviert und der Immunglobulin-Klassenwechsel unterstützt. So produzieren B-Lymphozyten unter Einfluß von IL-4 verstärkt IgG und IgE. IgG neutralisiert Toxine und Viren, während IgE Basophilen und Eosinophilen das Abtöten großer Parasiten wie z.B. Helminthen ermöglicht. IL-5 unterstützt den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgA, das im Darmlumen die Adhäsion von Mikroorganismen verhindert.



**Abb. 1.** Schema der durch  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen produzierten Zytokine und ihrer Effekte (aus (1)).

$T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen entwickeln sich aus naiven T-Zellen ( $T_H0$ ) unter Einfluß von IL-12 ( $T_H1$ ) bzw. IL-4 ( $T_H2$ ) (59). Beide Subpopulationen beeinflussen sich gegenseitig, indem sie die Differenzierung der Vorläuferzellen in die jeweils andere Subpopulation unterdrücken. In der frühen Phase einer Infektion muß daher sichergestellt werden, daß die passende Helfer-Population induziert wird. An diesem Prozeß sind hauptsächlich Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt. Infizierte Makrophagen und dendritische Zellen können IL-12 produzieren (60-62) und so die Differenzierung inflammatorischer T-Zellen unterstützen. Gleichzeitig induziert IL-12 die Produktion von IFN-γ durch NK-Zellen, was diesen Effekt noch verstärkt. Für die frühe Produktion von IL-4 und somit die Differenzierung von  $T_H2$ -Zellen während einer Infektion sind verschiedene Zellen verantwortlich, darunter Basophile, Eosinophile und einige nicht-konventionelle T-Zellen (siehe S. 11).



Die Differenzierung in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen ist nicht strikt getrennt, vielmehr wird die Entwicklung in die eine oder andere Richtung nur verschoben. Außerdem scheint sie auch durch genetische Faktoren beeinflusst zu werden, da in einigen Mausstämmen die Differenzierung in eine bestimmte Richtung begünstigt ist. So entwickeln z.B. BALB/c Mäuse nach Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Leishmania major* eine nicht-protektive T<sub>H</sub>2-Antwort, während bei C57Bl/6 Mäusen eine protektive T<sub>H</sub>1-Antwort induziert wird (63).

### 1.2.2.2 Nicht-konventionelle T-Zellen

Neben der großen Gruppe der konventionellen T-Zellen sind verschiedene, recht heterogene T-Zellpopulationen an der Immunabwehr gegen Mikroorganismen beteiligt, die auch als nicht-konventionelle T-Zellen bezeichnet werden. Sie besitzen einige ungewöhnliche Eigenschaften bezüglich ihrer Entwicklung, Restriktion, der Art der von ihnen erkannten Antigene oder ihrer Oberflächenmarker.

In Mäusen existiert eine Population CD8-positiver T-Zellen mit  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor, die Peptide mit formyliertem Methionin am N-Terminus erkennen (64). Solche Peptide stammen aus bakteriellen Signalsequenzen und kommen bei Säugern nur in mitochondriellen Proteinen vor. Sie werden nicht durch klassische MHC I-Moleküle, sondern durch H2-M3, einem *nicht-klassischen MHC I-Molekül*, präsentiert. Nicht-klassische MHC I-Moleküle, auch als *MHC Ib-Moleküle* bezeichnet, sind nicht polymorph und werden häufig nicht von allen kernhaltigen Zellen exprimiert (65). Im Mausmodell konnte eine protektive Funktion H2-M3-restringierter T-Zellen bei Infektionen mit *Listeria monocytogenes* gezeigt werden (66). Auch im Menschen existieren MHC Ib-Moleküle, allerdings konnte noch kein Homolog zu H2-M3 identifiziert werden.

*DN T-Zellen* (Doppelt-negative T-Zellen) sind weder durch klassische noch durch nicht-klassische MHC-Moleküle, sondern durch CD1 restringiert. Humane dendritische Zellen exprimieren drei verschiedene CD1-Moleküle, CD1a, b und c (Gruppe 1 CD1). Diese Moleküle besitzen strukturelle Ähnlichkeit mit MHC I, sind jedoch nicht polymorph (67, 68). Außerdem werden sie in denselben Zellkompartimenten beladen wie MHC II-Moleküle, präsentieren also exogenes Antigen (69, 70). DN T-Zellen erkennen keine Peptide, sondern lipidartige Verbindungen, die von Mycobakterien stammen. Dazu gehören Lipoarabinomannan (LAM) sowie Mycolsäuren (71, 72). Zumindest für LAM wurde eine spezifische Aufnahme durch kultivierte humane dendritische Zellen mit Hilfe des Mannose-Rezeptors gezeigt (73). Häufig erkennen DN T-Zellen auch CD1 ohne Fremd-Antigen, sind also potentiell autoreaktiv (74). Sie exprimieren vorwiegend einen  $\alpha\beta$  TCR (obwohl auch CD1-restringierte DN T-Zellklone mit  $\gamma\delta$  TCR isoliert wurden), sind negativ für CD4 und CD8 (Doppelt-negativ: DN) und

besitzen lytische Aktivität. Im Unterschied zu den klassischen T-Zellen sind sie oft CD28-negativ und erhalten kostimulatorischen Signale dann nicht durch B7, sondern über einen bislang unbekannten Signalweg (75).

Es wird vermutet, daß DN T-Zellen in der frühen Phase einer Infektion mit Mycobakterien eine Rolle spielen und die Art der nachfolgenden T-Zell-Antwort ( $T_H1$  oder  $T_H2$ ) beeinflussen können. Bei Lepra-Patienten sind eine selbst-heilende und eine lepromatöse, aggressive Form der Krankheit bekannt. Während bei der selbst-heilenden Form in den Läsionen hauptsächlich  $T_H1$ -Zellen nachgewiesen wurden, herrscht bei der aggressiven Form der Lepra eine  $T_H2$ -Antwort vor (74). Der Nachweis von CD1b in Läsionen der selbst-heilenden Lepra legt die Vermutung nahe, daß DN T-Zellen, welche IFN- $\gamma$  produzieren, eine  $T_H1$ -Antwort hervorrufen und einen milderen Verlauf der Krankheit begünstigen. Es wird ebenfalls vermutet, daß DN T-Zellen eine Rolle bei der Induktion von Antikörpern gegen bestimmte nicht-repetitive bakterielle Lipopolysaccharide spielen, bei denen keine klassische T-Zell-Hilfe durch  $T_H2$ -Zellen stattfindet (siehe S.5). Humane B-Zellen exprimieren CD1c und könnten DN T-Zellen bakterielle Polysaccharide präsentieren, die daraufhin der B-Zelle Aktivierungssignale übermitteln (76). Auch die direkte Lyse mit Mycobakterien infizierter Makrophagen durch CD1-restringierte Zellen wurde gezeigt. Dabei erfolgt die Lyse über die Interaktion von Fas/FasL, da DN T-Zellen kein Perforin exprimieren. In derselben Studie wurden CD1-restringierte, CD8-positive T-Zellen beschrieben, welche infizierte Makrophagen mit Hilfe von Perforin lysierten (77). DN T-Zellen können im Gegensatz zu klassischen CTL allerdings nicht die intrazellulären Bakterien direkt abtöten, da sie kein Granulysin besitzen (54).

Außer CD1a-c, die bisher nur im Menschen nachgewiesen wurden, existiert sowohl im Menschen als auch in der Maus eine zweite Gruppe von CD1-Genen, von denen bisher nur eines (CD1d) in Protein-Form nachgewiesen werden konnte (67). Im Gegensatz zu den Molekülen der ersten Gruppe, die auf einigen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, ist die Verteilung von CD1d sehr heterogen, und die Funktion der mit CD1d interagierenden T-Zellen ist weitgehend unbekannt. CD1d wird (wie CD1a-c) auf einigen Thymozyten exprimiert, allerdings nicht auf Epithelzellen des Thymus, so daß eine Funktion in der Selektion von T-Zellen dort fraglich ist (74). Darüber hinaus findet man CD1d vorwiegend auf Epithelzellen des Darms sowie teilweise in Leber und Milz (67). Möglicherweise spielt CD1d eine Rolle bei der Selektion einer kleinen Population von T-Zellen, die vorwiegend im Darmepithel gefunden werden und anscheinend auch dort reifen (IEL; intraepithelial lymphocytes). Daneben wurden aus der Peripherie von Mensch und Maus ebenfalls CD1d-reaktive T-Zellen isoliert. Sie weisen ein sehr eingeschränktes TCR-Repertoire auf und exprimieren vorwiegend TCR V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11 (Mensch) bzw. TCR V $\alpha$ 14/V $\beta$ 8 (Maus) (78). Diese Gensegmente der beiden Spezies sind verwandt.

Murine CD1d-restringierte T-Zellen exprimieren die NK-Rezeptoren NKR-P1 und Ly-49 (78) und werden daher auch als *NK-T-Zellen* bezeichnet. Sie sind vorwiegend CD4-positiv (*CD4<sup>+</sup> NK-T-Zellen*). Ein Teil der murinen NK-T-Zellen kann aber auch CD4/CD8-doppelt-negativ sein (*DN NK-T-Zellen*). Dieselben Merkmale - Expression von NKR-P1 sowie CD4<sup>+</sup> oder CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Phänotyp - wurden auch für die entsprechende humane T-Zellpopulation beschrieben (79). Im humanen Blut gehören ca. 1/500 Lymphozyten dieser Population an (79).

Im Gegensatz zu den Gruppe 1 CD1-restringierten DN T-Zellen wurden bisher keine natürlichen Epitope für CD1d-restringierte T-Zellen gefunden. *In vitro* konnte zwar gezeigt werden, daß Maus-CD1d lange, hydrophobe Peptide bindet und murine NK-T-Zellen aktiviert, es ist aber nicht bekannt, ob solche hydrophoben Peptide *in vivo* zu den natürlichen Antigenen von NK-T-Zellen gehören (80). Allerdings können diese Zellen auch durch auf CD1d geladene synthetische Glycolipide (Glycosylceramide) stimuliert werden (81). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, daß CD1d-Moleküle, die von einer humanen Zelllinie isoliert wurden, eukaryontische Glykolipide (Glycosylphosphatidylinositol) präsentieren (82). Dies könnte die auch bei NK T-Zellen häufig beobachtete Autoreaktivität erklären (78) und läßt die Vermutung zu, daß solche Glykolipide, wie bei den CD1-Molekülen der Gruppe 1, die natürlichen Liganden für CD1d darstellen.

CD1d-restringierte T-Zellen weisen noch einen weiteren wichtigen Unterschied zu den durch CD1a-c-restringierten DN T-Zellen auf: sie produzieren große Mengen IL-4 (74, 78). Daher sind sie möglicherweise an der Induktion von T<sub>H</sub>2-Antworten beteiligt (83), während die übrigen DN T-Zellen eher die Entwicklung einer T<sub>H</sub>1-Antwort begünstigen (siehe oben). Dafür spricht auch, daß in  $\beta$ 2m-knockout-Mäusen, die zwar klassische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aber keine CD4<sup>+</sup> NK T-Zellen besitzen, die IL-4-Produktion in der Milz nach Injektion von anti-CD3 beeinträchtigt ist. Entsprechend bilden diese Mäuse nach anti-IgD-Injektion nur wenig IgE, wozu eine T<sub>H</sub>2-Antwort nötig wäre (84). Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zytokin-Produktion durch CD1d-restringierte, TCR V $\alpha$ 24-positive T-Zellen und dem Ausbruch der Autoimmunerkrankung Diabetes auf. Dabei wurden in Diabetes-Patienten weniger Vertreter dieser T-Zellpopulation gefunden als in Symptom-freien Risiko-Personen. Während TCR V $\alpha$ 24-positive T-Zellen der letzteren Gruppe sowohl IFN- $\gamma$  als auch IL-4 produzierten, ging die IL-4-Produktion durch diese Zellen bei Ausbruch der Diabetes-Symptome verloren (85).

Ob CD1d-restringierte T-Zellen auch eine Rolle bei Infektionen spielen, ist nicht endgültig geklärt. Die bisher veröffentlichten Daten hierzu sind teilweise widersprüchlich und schwer zu vergleichen, da in den entsprechenden Experimenten mit NK T-Zellpopulationen aus verschiedenen Organen gearbeitet wurde, die sich unterschiedlich verhalten könnten. Im Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes*

wurde gezeigt, daß die Zahl CD4/CD8-doppelt-negativer T-Zellen im Peritoneum nach der Infektion vorübergehend zunahm. Diese trugen entweder einen  $\alpha\beta$ - oder  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor, wobei 80 % der  $\alpha\beta$  T-Zellen V $\beta$ 8 und 30 % NK1.1 exprimierten (86). Es blieb in diesem System aber unklar, ob die beschriebene T-Zell-Population CD1-restringiert war und die Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen beeinflusste.

Hingegen konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, daß die Zahl der NK T-Zellen in der Leber, die bei Listerien-Infektionen hauptsächlich befallen wird, abnahm. Gleichzeitig produzierten Lymphozyten, die aus der Leber infizierter Mäuse isoliert wurden, nach Aktivierung durch anti-CD3 oder anti-TCR $\alpha/\beta$  wenig IL-4 und viel IFN- $\gamma$ , während dieses Verhältnis in nicht-infizierten Mäusen genau umgekehrt ist (87). In diesem Fall geht die Ausbildung einer protektiven T<sub>H</sub>1-Antwort mit der Herabregulierung IL-4-produzierender NK-T-Zellen einher. Darüber hinaus liegen Hinweise vor, daß die IL-4-produzierenden NK T-Zellen in der Leber aktiv an der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* teilnehmen. Demnach produzieren diese Zellen innerhalb der ersten halben Stunde nach der Infektion IL-4, wodurch die Ausschüttung des Chemokins MCP-1 durch Makrophagen gesteigert und so der Influx von Monozyten verstärkt wird. Diese NK T-Zellen sind kurz danach jedoch nicht mehr nachweisbar. Vermutlich hätte sonst das durch sie produzierte IL-4 in der späten Phase der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* einen schädlichen Effekt (88).

Vorstellbar ist ebenfalls eine protektive Funktion von NK T-Zellen bei Infektionen mit parasitären Erregern (z.B. Helminthen), zu deren Bekämpfung Antikörper und damit eine T<sub>H</sub>2-Antwort nötig sind. Allerdings sind  $\beta$ 2m-knockout-Mäuse, denen NK T-Zellen fehlen, durchaus in der Lage, nach Infektion mit *Nippostrongylus* oder *Leishmania* sowie nach Injektion löslicher Protein-Antigene IL-4 zu produzieren und somit eine T<sub>H</sub>2-Antwort auszubilden (83). Zusätzlich wurde bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii* auch eine protektive Funktion der NK T-Zellen durch Produktion von IL-2, welches wiederum CTL zur Produktion von IFN- $\gamma$  anregte, gezeigt (89). Es bleibt also vorerst unklar, auf welche Weise NK T-Zellen an der Ausbildung der protektiven Immunität beteiligt sind.

Wie eingangs erwähnt, existieren neben den T-Zellen mit  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor noch solche, deren TCR aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette aufgebaut ist und die ebenfalls meist CD4/CD8-doppelt-negativ sind. Sie werden als  *$\gamma\delta$ -T-Zellen* zusammengefaßt. Auch bei den oben beschriebenen nicht-konventionellen T-Zellen finden sich solche mit einem  $\gamma\delta$ -TCR. Die Verteilung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist stark Spezies-abhängig. Sie machen bei Mensch und Maus im Blut und in peripheren lymphatischen Geweben nur einen kleinen Teil der T-Zell-Population aus, stellen aber zumindest in der Maus einen großen Teil der T-Zellen in Epithelien, z.B. des Darms, der Haut und der Lunge (90). Im Gegensatz dazu sind sie in der

Blutzyrkulation von Schafen und Rindern sehr zahlreich. Obwohl diese Zellen schon vor einigen Jahren identifiziert wurden, ist über ihre Funktion nur sehr wenig bekannt. Sie scheinen bei Infektionen mit diversen Mikroorganismen eine Rolle zu spielen. So finden sie sich z.B. in den Läsionen von Lepra- und Leishmaniose-Patienten. Auch im Mausmodell wurde ein Anstieg der Anzahl an  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Infektionen mit Bakterien, Viren oder Parasiten beobachtet. Nach intraperitonealer Infektion mit *Listeria monocytogenes* findet sich im Peritoneum eine erhöhte Anzahl dieser Zellen, die auch eine protektive Funktion ausüben (91). Depletion dieser Zellpopulation führt zu einer verzögerten Beseitigung von Listerien. Umgekehrt sind TCR $\beta$ - oder  $\alpha$ -knockout-Mäuse, die keine klassischen T-Zellen besitzen, in der Lage, eine Listerien-Infektion in gewissem Umfang abzuwehren (zusammengefaßt in (90)).  $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen wahrscheinlich in der frühen Immunantwort eine T-Zell-Population mit redundanter Funktion dar. Eine primäre Infektion mit *L. monocytogenes* kann entweder allein durch  $\alpha\beta$ -T-Zellen oder aber durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen beseitigt werden. Bei einer sekundären Infektion wird die Protektion hauptsächlich durch  $\alpha\beta$ -T-Zellen vermittelt und  $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen eine eher untergeordnete Rolle (92). Wie klassische T-Zellen können sie, in Abhängigkeit vom Pathogen, für T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Antworten typische Zytokine produzieren (93). Möglicherweise kontrollieren sie auch die klassische T<sub>H</sub>1-Antwort. Im Infektionsmodell mit *L. monocytogenes* wurden in der Milz zum Zeitpunkt der stärksten IFN- $\gamma$ -Produktion (durch klassische T-Zellen) IL-10-produzierende  $\gamma\delta$ -T-Zellen gefunden, welche vermutlich zur Kontrolle der T<sub>H</sub>1-Antwort dienten (94).

Obwohl zahlreiche Daten den Einfluß der  $\gamma\delta$ -T-Zellen auf die Immunantwort gegen mikrobielle Erreger belegen, ist es in den untersuchten Modellsystemen bisher nicht gelungen, die Restriktion dieser Zellen zu bestimmen oder die von ihnen erkannten Antigene zu identifizieren. Aus *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen isolierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen konnten zwar mit Heat-Shock-Protein aus Mycobakterien stimuliert werden, aber nicht mit Hitze-inaktivierten Listerien (91). Auch humane  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen Antigene, die von Mycobakterien stammen. Sie exprimieren meist einen V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2-T-Zell-Rezeptor und erkennen verschiedene phosphorylierte, Protease-resistente Verbindungen (1, 90, 95, 96). Diese Zellen sind Teil einer Population von V $\gamma$ 9/C $\gamma$ 1-T-Zellen, die ca. 40-80% aller  $\gamma\delta$ -T-Zellen im humanen Blut ausmacht. Einige Vertreter dieser größeren Population lysieren aber auch bestimmte Target-Zellen ohne Zugabe eines Antigens (95). Daran ist zwar der T-Zell-Rezeptor beteiligt, aber diese Zellen sind durch kein bisher bekanntes MHC- oder MHC-ähnliches Molekül restringiert (95). Die Art der natürlichen Liganden der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bleibt also vorerst unbekannt, es wird allerdings diskutiert, daß es sich dabei um körpereigene Streß-Proteine handeln könnte (90).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß allen nicht-konventionellen T-Zellen (außer  $\gamma\delta$ -T-Zellen) eine Restriktion durch nicht-polymorphe Moleküle gemeinsam ist und daß sie, soweit bekannt, Antigene

erkennen, die typisch für mikrobielle Erreger und nur beschränkt variabel sind. Diese Zellen stehen also an der Grenze zwischen angeborener und erworbener Immunität. Inwieweit dabei CD1-restringierte Zellen eine protektive Funktion ausüben, bleibt Gegenstand von Spekulationen.

## 1.3 Antigen-Präsentation

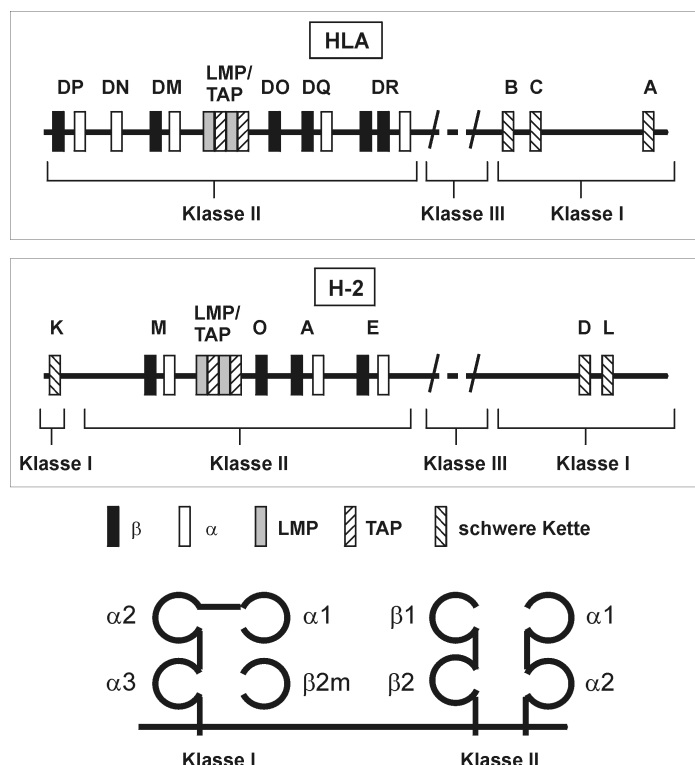
Im Verlauf der Einleitung wurde bereits einige Male auf die MHC-Restriktion eingegangen. Dieses Phänomen ist in der besonderen Art der Antigenerkennung durch T-Zellen begründet. Der T-Zell-Rezeptor erkennt einen Komplex aus einem MHC-Molekül und einem *Antigen-Fragment*, meist einem Peptid. Antigene müssen dazu *prozessiert* (proteolytisch gespalten), die Fragmente auf MHC-Moleküle geladen und die entstandenen Komplexe an die Zelloberfläche transportiert werden, um der Erkennung durch T-Zellen zugänglich zu sein. Wie schon erwähnt, tragen fast alle kernhaltigen Zellen MHC Klasse I-Moleküle (erkannt durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen), die endogene Peptide präsentieren, während nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen MHC Klasse II-Moleküle besitzen (erkannt durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen), die mit exogenen Peptiden beladen werden. Zusätzlich exprimieren einige Zellen (meist professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC)) nicht-klassische MHC-Moleküle bzw. CD1, welche modifizierte Peptide oder lipoide Verbindungen präsentieren und von nicht-konventionellen T-Zellen erkannt werden. Im folgenden sollen kurz die Struktur der verschiedenen MHC-Moleküle sowie die Mechanismen der Antigen-Prozessierung und -Präsentation beschrieben werden.

### 1.3.1 Struktur von MHC- und MHC-ähnlichen Molekülen

Allen MHC-Molekülen (klassischen und nicht-klassischen) sowie CD1 ist ein strukturelles Hauptmerkmal gemeinsam: sie bestehen aus vier Domänen, von denen zwei eine Grube ausbilden, in der Antigen-Fragmente gebunden werden können. Diese besitzt einen "Boden" aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur sowie zwei seitliche  $\alpha$ -Helices. Während bei MHC Klasse II-Molekülen die Grube aus je einer N-terminalen Domäne zweier membranverankerter Polypeptidketten ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette) gebildet wird, besitzen alle anderen nur eine membranverankerte Kette ( $\alpha$ -Kette). Diese besteht aus drei Domänen, von denen die beiden N-terminalen und Membran-distalen die Grube ausbilden. Klassische und nicht-klassische MHC I-Moleküle sowie CD1 sind außerdem mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) assoziiert, das zwar nicht direkt zur Bindung des Antigen-Fragments beiträgt, für die Stabilität des Komplexes aber unerlässlich ist (Abb. 2) (44, 67, 97).

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit besitzen die verschiedenen MHC-Moleküle und ihre Verwandten charakteristische Eigenschaften bezüglich der Art der gebundenen Antigen-Fragmente. MHC I-Moleküle binden Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren. Dabei wird die Bindung an MHC I über wenige konservierte Ankerpositionen in den Peptiden vermittelt, während die übrigen Aminosäuren der Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor zugänglich sind (98, 99). Da die Grube bei MHC I-Molekülen an beiden Enden geschlossen ist, liegen die Ankerpositionen für ein bestimmtes MHC I-Molekül immer an derselben Stelle im Peptid. MHC II-Moleküle hingegen besitzen eine Grube mit offenen Enden. Daher können sie Peptide variabler Länge (12-24 Aminosäuren) binden, wobei nur die relative Position der Anker-Aminosäuren zueinander gleich bleibt, diese aber aufgrund der Längenvariationen in unterschiedlicher Entfernung zu den Enden des Peptids liegen können. CD1-Moleküle besitzen eine sehr tiefe, hydrophobe Grube (100). Obwohl die Bindung hydrophober Peptide und Glykosylceramide an CD1d in *in vitro*-Versuchen gezeigt wurde (80, 81), wurden als natürliche Liganden bisher nur für CD1 b und c Glykolipide aus der Zellwand von Mycobakterien (72, 101) sowie für CD1d autologe Glykolipide (82) identifiziert. Vermutlich sind sie mit ihrem Lipid-Anteil in der Grube verankert, während der Polysaccharid-Anteil vom TCR erkannt wird (83, 102). Bei nicht-

klassischen MHC-Molekülen (MHC Ib) wurde bisher nur H2-M3 aus der Maus genauer charakterisiert. Es bindet kurze, hydrophobe Peptide, die ein formyliertes Methionin am N-Terminus besitzen (97).



**Abb. 2.** Die Organisation der Gene im humanen HLA bzw. im H-2 der Maus. Die Organisation der Domänen in MHC I- und II-Molekülen ist ebenfalls gezeigt. Nicht-klassische MHC I-Moleküle sowie CD1 entsprechen in ihrer Domänenstruktur den MHC I-Molekülen. Aus (44), verändert.

Die Bezeichnung MHC (major histocompatibility complex) bezieht sich auf den Genort, an dem fast alle für die Antigenpräsentation wichtigen Proteine codiert sind. Beim Menschen wird er als HLA (human leukocyte antigen) und bei der Maus als H-2 bezeichnet. Die Organisation des MHC (Abb. 2) ist bei Mensch und Maus sehr ähnlich, im folgenden wird daher hauptsächlich auf den humanen MHC eingegangen. Der komplizierte Aufbau des MHC (der humane MHC umfaßt über 100 Gene) kann hier nur

vereinfacht wiedergegeben werden. Die Gene für MHC Klasse I- und II-Moleküle liegen in unterschiedlichen Bereichen. Es existieren drei Gene für die  $\alpha$ -Kette von MHC I, HLA-A bis HLA-C (bei der Maus H2-K, D, L), die im selben Bereich liegen wie die Gene für MHC Ib-Moleküle (beim Menschen als HLA-E bis HLA-J bezeichnet). Interessanterweise ist  $\beta_2m$  (wie CD1) auf einem anderen Chromosom codiert. Drei Genloci codieren für MHC II-Moleküle, HLA-DP, DQ und DR. Dabei werden die Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten mit A bzw. B bezeichnet. HLA-DRB bezeichnet also das Gen für die  $\beta$ -Kette des MHC II-Moleküls DR. Außerdem existieren mehrere DRB-Gene, deren Genprodukte mit der DR $\alpha$ -Kette assoziieren können. Zwischen den Genen, welche die eigentlichen MHC-Moleküle kodieren, liegen weitere, deren Produkte an der Antigen-Präsentation beteiligt sind (LMP2 und 7; TAP1 und 2; HLA-DMA und B; HLA-DO, HLA-DN). Der sogenannte Klasse III-Bereich des MHC trägt u.a. die Gene für TNF- $\alpha$ ,  $\beta$  und Komplement-Proteine.

Die klassischen MHC-Moleküle besitzen einen ausgeprägten *Polymorphismus*, d.h. für jedes Gen existieren beim Menschen zwischen 8 und 122 verschiedene Allele (4). Eine Ausnahme bildet nur HLA-DRA, für das nur ein Allel bekannt ist. Dies wird aber durch den Polymorphismus der  $\beta$ -Ketten ausgeglichen. Nicht-klassische MHC-Moleküle und CD1 hingegen besitzen keinen oder nur sehr geringen Polymorphismus. Der Polymorphismus der MHC I- und II-Moleküle besitzt entscheidenden Einfluß auf das Repertoire potentieller Antigene, das durch T-Zellen erkannt werden kann. Da ein bestimmtes MHC-Molekül nur Peptide mit den passenden Ankerpositionen binden kann, stellt der Polymorphismus innerhalb einer Population sicher, daß insgesamt ein breites Spektrum von Peptiden präsentiert werden kann. Dies zeigt sich bereits auf der Ebene einzelner Individuen. So besitzen HIV-infizierte Personen mit heterozygoten MHC I-Genen eine höhere Überlebenschance als solche, die für eines oder mehrere MHC I-Gene homozygot sind (103).

Diese Vielfalt zieht aber auch Nachteile bei der Entwicklung potentieller Impfstoffe nach sich, da ein Vakzin Epitope enthalten sollte, die von den MHC-Molekülen möglichst vieler Individuen präsentiert werden können. Daher sind gerade die nicht-polymorphen Moleküle (MHC Ib und CD1) für dieses Gebiet interessant. Es existieren aber auch Antigene, die promiskuös an verschiedene MHC II-Moleküle binden können (104, 105). Dies wurde z.B. für zwei Peptide (p2 und p30) aus Tetanus-Toxin gezeigt, die an unterschiedliche HLA-DR-Moleküle binden können (106). Der Einfluß des Haplotyps auf die Immunantwort zeigt sich auch darin, daß einige Autoimmunkrankheiten wie z.B. Diabetes mit der Expression bestimmter MHC-Allele assoziiert sind (107-109). Auch für HIV-infizierte konnte ein erhöhtes Risiko der Ausbildung von AIDS bei Expression bestimmter MHC I-Allele gezeigt werden (103). Weiterhin scheint der MHC-Haplotyp einen Einfluß auf die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Antwort in der spezifischen zellulären Immunantwort auszuüben (110).

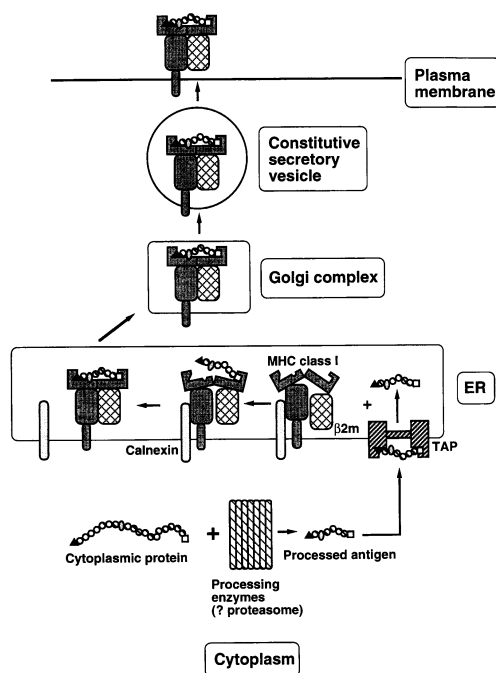


### 1.3.2 MHC Klasse I-abhängige Antigen-Präsentation

Alle kernhaltigen Körperzellen besitzen MHC Klasse I-Moleküle und präsentieren ständig endogene Peptide, die aus dem normalen Stoffwechsel zytosolischer Proteine stammen. Diese werden zunächst durch multikatalytische Proteasekomplexe, sog. *Proteasomen*, in Peptide variabler Länge gespalten, die teilweise in das Endoplasmatische Retikulum transportiert und auf neusynthetisierte MHC I-Moleküle geladen werden. Proteasomen sind Teil des Ubiquitin-abhängigen Abbauweges für zytosolische Proteine (111). Sie besitzen einen röhrenförmigen Kern aus 28 Untereinheiten, in dem die entfalteten Proteine gespalten werden (20S Proteasom), und können mit endständigen regulatorischen Komplexen (19S Regulator und PA28) assoziiert sein (112). Durch den Austausch einiger Untereinheiten des Kernkomplexes kann die Art der gebildeten Peptide beeinflusst werden. Ein kleiner Teil der 20S Proteasomen enthält die Untereinheiten LMP2 und LMP7, die im MHC codiert sind (s.o.). Solche Proteasomen (auch als *Immunoproteasomen* bezeichnet) bilden bevorzugt Peptide mit basischen oder hydrophoben C-Termini (4). Diese wiederum werden besonders effizient durch TAP (s.u.) in das ER transportiert und auch bevorzugt auf MHC I-Moleküle geladen. Auch die Assoziation mit PA28 scheint die Bildung von Peptiden zu begünstigen, die an MHC I binden können. Unter dem Einfluß von IFN- $\gamma$ , einem der wichtigsten Zytokine bei Infektionen mit Viren oder intrazellulären Mikroorganismen, wird u.a. der Anteil der Immunoproteasomen erhöht und die Expression von PA28 induziert (4, 111).

Die entstandenen Peptide werden unter ATP-Verbrauch in das ER transportiert. Hierfür ist der TAP-Transporter (transporter associated with antigen presentation) verantwortlich, ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2 (beide im MHC codiert, s.o.), deren Expression ebenfalls durch IFN- $\gamma$  erhöht wird (113). Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren werden bevorzugt transportiert (114). Darüber hinaus besitzt der murine TAP auch eine gewisse Sequenzspezifität. Er transportiert bevorzugt Peptide mit hydrophoben Aminosäuren am N-terminus (115). Im ER kann weiteres N-terminales Trimmen der Peptide durch Aminopeptidasen stattfinden, während der C-Terminus offensichtlich nicht weiter verändert wird (112, 116). Auch ein Transport von Peptiden unter ATP-Verbrauch zurück in das Zytosol, Trimmen durch zytosolische Proteasen und Rücktransport in das ER wird diskutiert (113, 117).

Nur neusynthetisierte MHC I-Moleküle werden mit Peptiden beladen. Die Bindung des Peptids ist dabei essentiell für die Stabilität des MHC I-Moleküls. So wird sichergestellt, daß nur beladene MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Eine neusynthetisierte MHC I  $\alpha$ -Kette wird in das ER transportiert und dort zunächst durch das Chaperonin *Calnexin* stabilisiert. Nach Assoziation der  $\alpha$ -Kette mit  $\beta_2m$  wird *Calnexin* durch *Calreticulin* ersetzt. Dieser Komplex assoziiert unter Beteiligung von *Tapasin* mit dem TAP-Transporter. Durch die Bindung eines passenden Peptids in der Grube wird das MHC I-Molekül stabilisiert, dissoziiert von den Chaperoninen und TAP und kann über den Golgi-



**Abb. 3.** Schematische Darstellung der Prozessierung von Proteinen für die Präsentation auf MHC I-Molekülen. Aus (44).

Apparat an die Zelloberfläche transportiert werden (4, 111, 113, 118). Die Vorgänge bei der Beladung von MHC I-Molekülen sind in Abb. 3 schematisch zusammengefaßt.

Zellen, welche mit Viren oder im Zytosol residierenden Mikroorganismen infiziert sind, präsentieren neben Fragmenten zelleigener Proteine auch solche, die aus Fremdproteinen stammen und können somit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt und beseitigt werden. Die Präsentation fremder Antigene ist sehr effizient. So werden ca. 35 p60-Moleküle (ein aus *L. monocytogenes* stammendes Antigen) benötigt, um ein MHC I-Epitop zu erhalten (119). Insgesamt reichen ungefähr 200 MHC I-Komplexe auf einer Zelle, beladen mit demselben Epitop, aus, um CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren (112, 120). Dabei wird ein MHC/Pep-

tid-Komplex nacheinander von mehreren hundert T-Zell-Rezeptoren auf der T-Zelle erkannt, welche die erhaltenen Signale “addiert” (120). Zur Auslösung der Zellyse durch CTL soll sogar ein einziger MHC/Peptid-Komplex auf der Zielzelle ausreichen (121). Vermutlich deshalb haben viele Viren Mechanismen zur Blockierung der MHC Klasse I-abhängigen Antigenpräsentation entwickelt, indem sie z.B. den TAP-Transporter blockieren bzw. die Synthese oder den Transport der MHC I-Komplexe aus dem ER inhibieren (113, 122). Sie bleiben dadurch für spezifische zytotoxische T-Zellen “unsichtbar”.

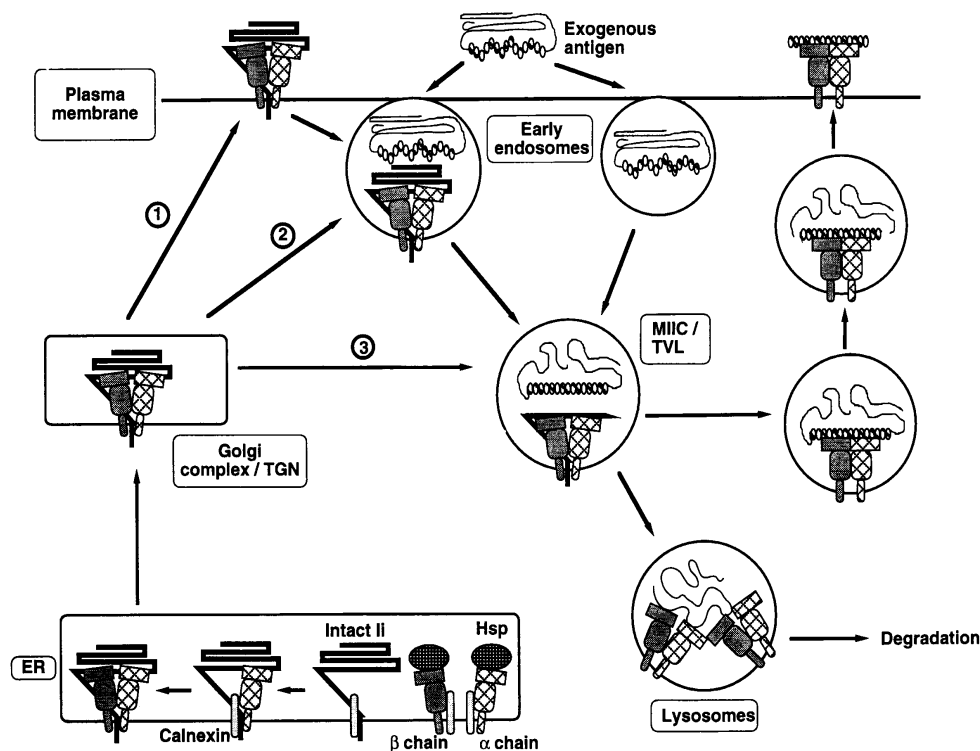
In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, daß MHC I-Moleküle auch mit Peptiden beladen werden können, die nicht dem klassischen endogenen Prozessierungsweg entstammen. Viele intrazelluläre Pathogene wie Leishmanien, Mycobakterien, Toxoplasmen usw. haben unterschiedliche Strategien entwickelt, in Phagosomen zu überleben (123). Obwohl sie nicht in das Zytosol gelangen, werden bei einer Infektion mit diesen Organismen unter anderem auch spezifische CD8-T-Zellen induziert (5). In professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen sowie in Mastzellen wurden mehrere alternative Prozessierungswege zur Beladung von MHC I-Molekülen mit exogenem Antigen entdeckt (50). So können Proteine aus lysosomalen Kompartimenten über einen unbekannten Mechanismus in das Zytosol transportiert und dort prozessiert werden. Von dort aus gelangen die entstandenen Peptide über TAP in das ER und werden wie im klassischen Prozessierungsweg auf MHC I-Moleküle geladen (124).

Es wurden auch mehrere TAP-unabhängige Prozessierungswege gefunden, bei denen die Beladung in lysosomalen Kompartimenten stattfindet. Diese stehen mit dem vesikulären Transport in Verbindung. So kann das geladene Peptid während des Transports von MHC I-Molekülen zur Oberfläche ausgetauscht werden. Alternativ können re-internalisierte MHC I-Moleküle in lysosomalen Vesikeln erneut beladen werden. Ein dritte Möglichkeit ist die Exozytose von Antigenen und Peptiden. Letztere könnten auf leere MHC I-Moleküle derselben oder benachbarter Zellen geladen werden, die in geringer Zahl auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Für Proteine wurde außerdem ein hsp90-abhängiger Transport direkt in das Zytosol gezeigt (zusammengefaßt in (49, 50, 123, 125)). Solche alternativen Prozessierungsmechanismen könnten außer bei der Abwehr intrazellulärer Erreger auch beim sogenannten "Cross-Priming" eine Rolle spielen. Bei Virus-Infektionen sowie Tumorerkrankungen sind meist normale Körperzellen betroffen. Da diese aber naive CD8-T-Zellen nicht aktivieren können, nehmen vermutlich professionelle APC Bruchstücke abgestorbener Zellen oder lösliche Antigene (126) auf, präsentieren diese mit Hilfe alternativer Prozessierungswege auf MHC I-Molekülen und aktivieren in den Lymphknoten naive T-Zellen, die dann in den Tumor oder den Infektionsherd einwandern und infizierte oder entartete Körperzellen abtöten (49, 127).

### 1.3.3 MHC Klasse II-abhängige Antigen-Präsentation

MHC Klasse II-abhängige Antigen-Präsentation findet hauptsächlich in professionellen APC wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen statt. Diese nehmen exogene Antigene durch verschiedene Mechanismen wie Phagozytose, Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose auf und bauen sie in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten ab. Ein Teil der erhaltenen Peptide wird auf neusynthetisierte MHC II-Moleküle geladen, die zuvor vom ER zu den lysosomalen Kompartimenten transportiert wurden. Die beladenen MHC II-Moleküle wandern dann zur Zelloberfläche und können durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. Antigene intrazellulärer Pathogene, welche in Makrophagen oder dendritischen Zellen residieren, werden ebenfalls über diesen Weg präsentiert (44).

Neusynthetisierte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von MHC II-Molekülen werden in das ER transportiert. Dort werden sie zunächst durch Calnexin und verschiedene heat-shock Proteine stabilisiert und assoziieren mit der membrangebundenen invarianten Kette (Ii; invariant chain) (Abb.4). Diese besitzt mehrere Funktionen. Ein Teil von Ii, CLIP (class II-associated invariant-chain peptide), blockiert die Peptid-bindende Grube des MHC II-Moleküls, so daß dieses nicht frühzeitig im ER mit endogenen Peptiden oder entfalteten Proteinen beladen werden kann. Drei solcher Komplexe lagern sich über eine Bindungsstelle der invarianten Ketten zu einem Nonamer zusammen (128), das daraufhin von Calnexin freigegeben und, wie beladene MHC I-Moleküle, aus dem ER über den Golgi-Apparat zunächst zu sekretorischen Vesikeln



**Abb. 4.** Schematische Darstellung der Beladung von MHC II-Molekülen. TGN: trans-Golgi-Netzwerk; TVL: tubulovesikuläre Lysosomen (Makrophagen); MIIC: MHC II-Kompartimente (B-Zellen). Ziffern 1-3: neusynthetisierte MHC II-Moleküle können zunächst zu verschiedenen Stationen der Antigen-Prozessierung transportiert werden. Aus (44).

transportiert wird. Während MHC I-Moleküle direkt an die Oberfläche gelangen, werden die nonameren MHC II/Ii-Komplexe zu endozytischen Vesikeln umgeleitet, in denen sich auch aufgenommene Antigene befinden. Hierfür ist ein Sortierungssignal im zytoplasmatischen Teil der invarianten Kette verantwortlich (128). Die endozytischen Vesikel entwickeln sich zu sauren Endosomen, in welchen der nonamere Komplex zunächst durch die invariante Kette zurückgehalten wird. Während dieser Reifung werden auch aufgenommene Proteine zu Peptiden abgebaut. In den sauren Endosomen wird zunächst das C-terminale Trimerisierungs-Signal und später der größte Teil der invarianten Kette durch Cathepsine abgespalten, so daß nur CLIP gebunden bleibt. CLIP kann dann durch antigene Peptide ersetzt werden. Dieser Prozeß erfordert die Anwesenheit von HLA-DM (in der Maus H2-M), einem MHC II-ähnlichen Heterodimer. Dabei stabilisiert HLA-DM das leere MHC II-Molekül und hält es im Lysosom zurück. In diesem Gleichgewichtszustand können sowohl antigene Peptide als auch CLIP binden (129). Durch Bindung eines hochaffinen Peptids mit niedriger Dissoziationskonstante bleibt das MHC II-Moleküle auch ohne Assoziation mit HLA-DM stabil und wird dem Gleichgewicht entzogen, während niedrigaffine Peptide wieder ersetzt werden können. Dieser Prozeß wird auch als “kinetic proofreading” bezeichnet. An ihm ist ein weiteres MHC II-ähnliches Molekül, HLA-DO, beteiligt, das vermutlich als Chaperonin für HLA-DM fungiert. Da die Peptid-bindende Grube des MHC II-Moleküls

offene Enden besitzt, könnten anstelle von Peptiden auch antigene Determinanten von entfalteten Proteinen gebunden werden, wobei die Überhänge erst nachträglich entfernt werden. Sobald das MHC II-Moleküle durch die Bindung eines Peptides stabilisiert ist, wird es nicht länger im Lysosom zurückgehalten und kann an die Zelloberfläche transportiert werden (zusammengefaßt in (118, 130-132)).

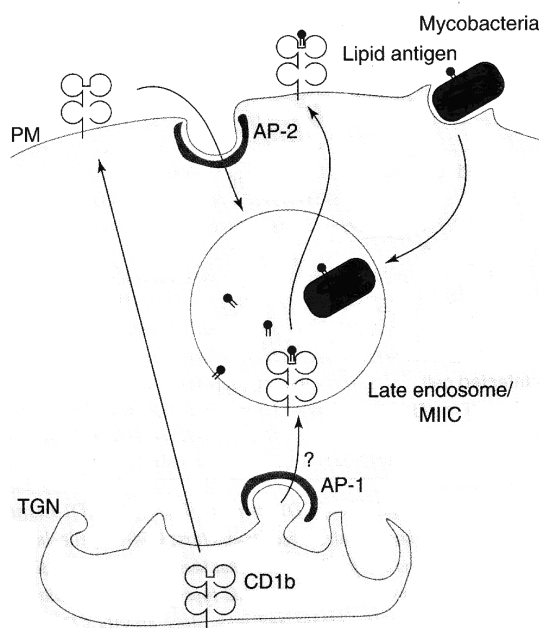
In einigen professionellen APC wie dendritischen Zellen und B-Zellen wurden spezielle Kompartimente identifiziert, in denen vermutlich die oben beschriebene Beladung mit *Ii*-abhängigen Antigenen unter Beteiligung von HLA-DM stattfindet (133-135). Sie werden als MIIC (MHC class II compartment) bezeichnet und entwickeln sich aus frühen Endosomen (136). Dabei durchlaufen sie eine Reifung über multivesikuläre Kompartimente zu typischen multilaminaren Strukturen, die u.a. reich sind an HLA-DM und MHC II, aber kaum *Ii* besitzen, also späten Endosomen entsprechen (136).

MHC II-Moleküle können von der Zelloberfläche zurück in endozytische Vesikel transportiert und in frühen endosomal Kompartimenten erneut beladen werden. Dafür ist ein Sortierungssignal in der  $\beta$ -Kette verantwortlich (137). Durch diesen Mechanismus können evtl. Peptide präsentiert werden, die ansonsten in den sauren Endosomen vollständig abgebaut würden. Da bei der Beladung rezirkulierender MHC II-Moleküle in frühen Endosomen die invariante Kette nicht beteiligt ist, werden solche Antigene als *Ii-unabhängig* bezeichnet (130). Darüber hinaus können auch endogene Antigene in den MHC Klasse II-Präsentationsweg gelangen. Dies geschieht entweder durch aktiven Transport in MIIC's hinein oder durch Autophagie. Bei diesem Prozeß schnüren frühe Endosomen Teile des Zytoplasmas ein, wodurch die typischen multivesikulären Strukturen entstehen und zytosolische Proteine der Präsentation durch MHC II zur Verfügung stehen (136).

### 1.3.4 Antigen-Präsentation durch CD1

Bisher liegen nur für CD1-Moleküle der Gruppe 1, im besonderen CD1b, Daten betreffend der Antigen-Prozessierung vor. Daher werden im folgenden nur die Mechanismen der Antigen-Präsentation durch CD1b beschrieben.

CD1-Moleküle der Gruppe 1 wurden bisher nur auf professionellen APC (CD1a-c auf dendritischen Zellen, CD1c auf einigen B-Zellen) nachgewiesen. Sie scheinen, obwohl sie strukturell eher MHC I-Molekülen ähneln, in denselben spezialisierten Zellkompartimenten beladen zu werden wie MHC II-Moleküle und präsentieren daher exogene Antigene (70, 102). Die Vorgänge bei der Synthese von CD1 ähneln denen bei der Synthese von MHC I-Molekülen. CD1b wird im ER zunächst durch Calnexin stabilisiert und verläßt das ER nur nach Assoziierung mit  $\beta_2m$  (138). Bisher ist nicht bekannt, ob für die

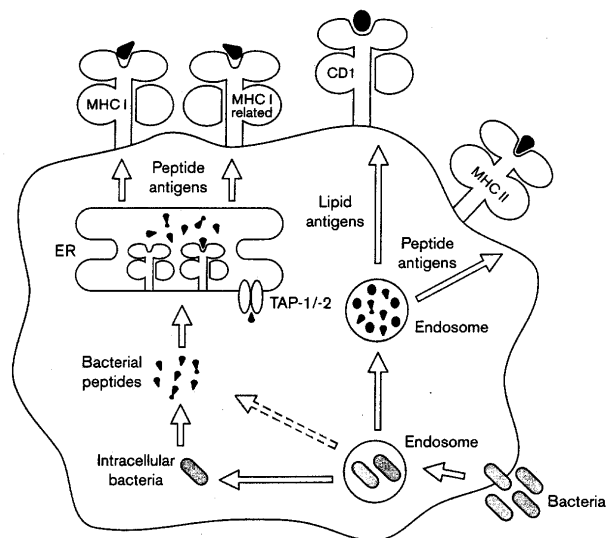


**Abb. 5.** Beladung von CD1b. Aus (102).

Bisher ist strittig, ob CD1b direkt oder über einen Umweg über die Zelloberfläche zu MIIC's transportiert wird (102).

Die Beladung von CD1 mit Antigen erfolgt nur unter sauren Bedingungen (73, 101) und ist abhängig von der Signalsequenz im CD1b (140). Daher findet sie wahrscheinlich, wie die der neusynthetisierten MHC II-Moleküle, in den späten Endosomen bzw. MIIC's statt. Die bisher identifizierten natürlichen Liganden für CD1-Moleküle der Gruppe 1 sind Lipide oder Glykolipide aus der Zellwand von Mycobakterien. Sie könnten also direkt von intrazellulären Bakterien stammen (102). Zusätzlich wurde gezeigt, daß lösliches Lipoarabinomannan aus Mykobakterien von dendritischen Zellen über den Mannose-Rezeptor aufgenommen und in MIIC's angereichert wird (73).

Stabilisierung des Komplexes, wie bei MHC I-Molekülen, die Antigen-Bindungsstelle besetzt sein muß. Da auf humanen intestinalen Epithelzellen CD1d-Moleküle nachgewiesen wurden, die nicht mit  $\beta_2m$  assoziiert sind (139), könnte die CD1-Kette allein schon stabil genug sein. Ein Sortierungssignal im zytoplasmatischen Teil von CD1b ist verantwortlich für den Transport in MHC II-Kompartimente (Abb. 5). Dieses Sortierungssignal besitzt auch CD1c, aber nicht CD1a. CD1a findet sich dementsprechend nicht in MIIC's (102). Die Sortierungssequenz interagiert mit Adaptor-Proteinen (AP-1 und AP-2), welche derart markierte Proteine in "Clathrin-coated pits" und "clathrin-coated vesicles" leiten.



**Abb. 6.** Antigen-Präsentation durch die drei Klassen Antigen-präsentierender Moleküle: CD1; MHC II; MHC I und MHC I-ähnliche. Gezeigt ist die Prozessierung bakterieller Antigene durch eine CD1-positive APC (z.B. Gewebe-Makrophagen). Aus: (70), verändert.

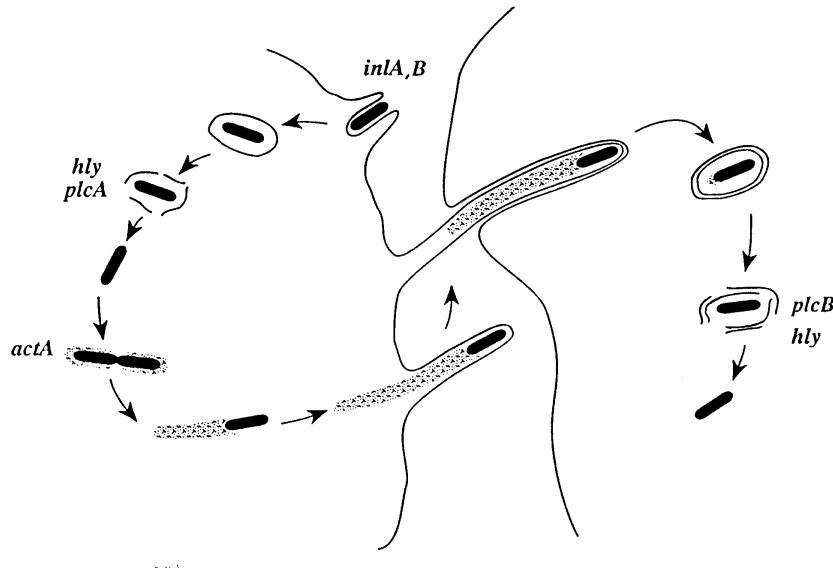
In Abb. 6 sind noch einmal die Prozessierungswege für Antigene, welche durch MHC I/II-, MHC I-ähnliche und CD1-Moleküle präsentiert werden, am Beispiel der Präsentation bakterieller Antigene, vergleichend zusammengefaßt (70).

## 1.4 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* ist ein gram-positives Bakterium, das im Boden oder in verschiedenen Nahrungsmitteln vorkommt und daher häufig mit der Nahrung aufgenommen wird. Es stellt für gesunde Menschen keine Bedrohung dar (141). Durch hohe Bakterienfracht in verdorbenen Nahrungsmitteln kann es gelegentlich lokal begrenzte, epidemieartige Ausbrüche von Diarrhoe verursachen (142, 143). Bei immunsupprimierten Personen sowie, in der Schwangerschaft, beim ungeborenen Kind, kann dieser Erreger jedoch die *Listeriose* hervorrufen. Diese ist gekennzeichnet durch Sepsis, Enzephalitis und Meningitis und kann bei Schwangeren zum Abort oder schwerer Infektion des Neugeborenen führen. Die Mortalität liegt trotz Behandlung bei 20 bis 30 Prozent (141, 144, 145). Mitunter tritt auch diese schwere Form der Listeriose epidemieartig auf (146, 147). Von den sieben Arten der Gattung *Listeria* ist nur *L. monocytogenes* humanpathogen, während *L. ivanovii* (wie auch *L. monocytogenes*) Listeriose in Tieren verursacht.

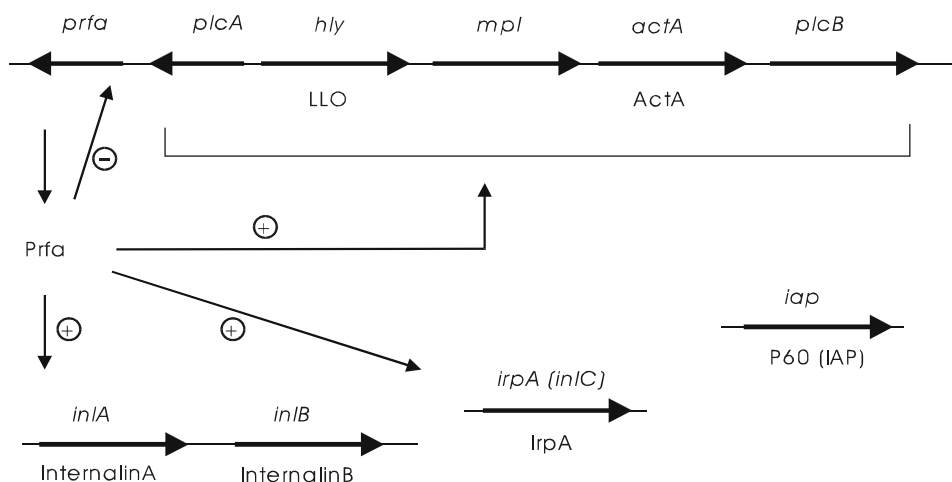
### 1.4.1 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren

*Listeria monocytogenes* durchläuft im Wirt einen intrazellulären Infektionszyklus (Abb. 7), für den mehrere Virulenz-Faktoren verantwortlich sind. Die Bakterien werden hauptsächlich durch Makrophagen aufgenommen, können aber auch ihre Aufnahme durch nicht-phagozytische Zellen mit Hilfe von Internalin A bzw. B (InlA, InlB) aktiv induzieren. Nachfolgend entweichen sie aus der Vakuole in das Zytosol. Dafür sind das Hämolysin Listeriolysin O (LLO) sowie eine Phospholipase (PI-PLC, Phosphatidylinositol-Phospholipase C) verantwortlich. Die bei 37 °C unbegeißelten Bakterien teilen sich im Zytosol und rekrutieren mit Hilfe des Virulenzfaktors ActA das Aktin der Wirtszelle, das in typischer Kometenschweif-artiger Form polymerisiert und so den Listerien eine gerichtete Fortbewegung und die Bildung von Zell-Ausstülpungen ermöglicht, mit deren Hilfe Nachbarzellen infiziert werden können. Dort sind die Listerien zunächst von einer Doppelmembran umschlossen, die mit Hilfe einer Lecithinase lysiert wird. Daraufhin beginnt der Infektionszyklus von neuem (zusammengefaßt in (46, 148, 149)).



**Abb. 7.** Infektionszyklus von *L. monocytogenes*. Die für die einzelnen Schritte des Infektionszyklus wichtigen Gene sind angegeben. Aus (149), verändert.

Die meisten Virulenz-Faktoren sind zu einem Gen-Cluster zusammengefaßt, in dem auch der positive Transkriptionsfaktor PrfA kodiert ist, welcher die Expression aller Virulenz-Faktoren außer p60 (s.u.) kontrolliert (150-152). Die Gene für die Internaline liegen außerhalb dieses Clusters (Abb. 8). Zur Internalin-Familie gehören 5 weitere Gene, darunter IrpA (Internalin related proteinA = *inlC*) (153, 154), denen aber bisher keine Funktion in der Invasion von Wirtszellen zugeordnet werden konnte (46). Bisher wurde nur für InlA ein Rezeptor auf epithelialen Zellen identifiziert, das E-Cadherin (155). Außer den "echten" Virulenzfaktoren wird von einigen Autoren einem weiteren Protein, der Murein-Hydrolase p60, eine Beteiligung bei der Infektion bestimmter Zellen zugeschrieben (156-158). p60 ist ein essentielles, bei der Zellteilung benötigtes Protein, zu dem allerdings auch homologe Proteine in apathogenen Listerien existieren (159, 160).



**Abb. 8.** Virulenz-Faktoren von *L. monocytogenes*. Nach (46), verändert.



Die Spezies *L. ivanovii* und *L. seeligeri* besitzen ebenfalls einen Virulenz-Cluster mit Genen, welche homolog zu den Virulenz-Clustern von *L. monocytogenes* sind. Jedoch sind diese Arten tierpathogen (*L. ivanovii*) oder sogar apathogen (*L. seeligeri*). Dies könnte durch verminderte Zytotoxizität der Hämolyse Ivanolysin bzw. Seeligerolysin oder durch das Fehlen anderer essentieller Pathogenitätsfaktoren verursacht sein (148).

### 1.4.2 Infektionsverlauf und Immunantwort

Der Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* ist im murinen System sehr gut charakterisiert. Man nimmt an, daß die Infektion im Menschen ähnlich verläuft. Nach Aufnahme mit der Nahrung überwindet *L. monocytogenes* zunächst die Darmbarriere. Viele bakterielle Pathogene erreichen dies, indem sie über M-Zellen aufgenommen werden (161, 162). Für Listerien hingegen scheinen weder M-Zellen noch das sie umgebende Epithel oberhalb der Peyer'schen Plaques eine bevorzugte Eintrittspforte zu sein (163). Trotzdem vermehren die Listerien sich zunächst hauptsächlich in Makrophagen der Peyer'schen Plaques.

Die Aufnahme wird durch die Expression von LLO, ActA und InlA/B nicht beeinflusst. Sogar die apathogene Spezies *L. innocua* (die keines der Virulenz-Gene besitzt) kann das Darmepithel auf die gleiche Weise durchdringen (163). Die Rolle der Internaline bei der Aufnahme der Bakterien *in vivo* bleibt deshalb vorerst unklar; evtl. spielen sie eine Rolle in späteren Phasen der Infektion, so z.B. bei der Überwindung der Plazenta oder der Blut-Hirn-Schranke (46). Innerhalb kurzer Zeit nach dem Eindringen gelangen die Bakterien über Lymphe und Blut hauptsächlich in Leber und Milz. Während sie in letzterer nur durch Makrophagen aufgenommen werden (5), infizieren sie in der Leber außerdem noch Hepatozyten, vermutlich mit Hilfe von InlB (164). Die Aufnahme durch Makrophagen hingegen erfolgt vermutlich über verschiedene Mechanismen, an denen Komplement-Komponenten sowie Oberflächen-Rezeptoren der Makrophagen für Lipoteichonsäuren, einem Zellwand-Bestandteil gram-positiver Bakterien, beteiligt sein können (165). Die weitere Verbreitung der Listerien erfolgt durch direkte Zell-zu-Zell-Infektion, wofür die Expression von ActA benötigt wird (vgl. Infektionszyklus). Dabei könnte der Erreger mit Hilfe der Makrophagen in weitere Gewebe des Körpers gelangen. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß Listerien von infizierten Makrophagen aus auch in Nervenzellen eindringen können, was evtl. die neurologischen Schäden während einer Listeriose erklärt (166).

Obwohl die meisten Listerien bereits durch Granulozyten und nicht-aktivierte Makrophagen abgetötet werden (46), bedarf es zur vollständigen Überwindung der Infektion unter anderem einer Aktivierung von Makrophagen. In den ersten 72 Stunden nach der Infektion sind daran Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt. Infizierte Makrophagen produzieren IL-12 und TNF- $\alpha$ , welche wiederum NK-

Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  anregen (165, 167, 168). Vermutlich induzieren dabei Lipoteichonsäuren die IL-12-Produktion durch Makrophagen (169). IFN- $\gamma$  aktiviert zum einen Makrophagen, so daß aufgenommene Listerien effizienter abgetötet werden. Zum anderen werden die IL-12-Produktion und die Expression von MHC II- und kostimulatorischen Molekülen durch Makrophagen gesteigert und zytotoxische T-Zellen durch IFN- $\gamma$  aktiviert. IL-12 spielt, neben der Aktivierung der NK-Zellen, außerdem eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>H</sub>1-Zellen (S.9 und (94)). Durch aktivierte Makrophagen in der späten Infektionsphase produziertes IL-10 wirkt diesen Effekten entgegen, wodurch eine Kontrolle der Homöostase zwischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen ausgeübt wird (168, 170). Auf diese Weise spielt das angeborene Immunsystem eine fundamentale Rolle bei der Induktion der nachfolgenden inflammatorischen T-Zell-Antwort. Die Infektion mit Listerien induziert außerdem die Apoptose von Hepatozyten (171), woraufhin Neutrophile angelockt werden. Diese können, zumindest *in vitro*, extrazelluläre Listerien abtöten und schränken die Ausbreitung der Bakterien ein (165). Auch die direkte Lyse bzw. Induktion von Apoptose infizierter Hepatozyten durch Neutrophile wurde gezeigt (172). Diese Ergebnisse werden allerdings kontrovers diskutiert (171, 173).

Die Apoptose infizierter Hepatozyten könnte einen Schutzmechanismus darstellen. Es wird allerdings auch diskutiert, ob die Induktion der Apoptose wichtiger Effektorzellen des Immunsystems den Listerien nicht einen Vorteil verschaffen könnte. So wurde gezeigt, daß Listerien murine dendritische Zellen und Lymphozyten in Apoptose treiben können (174, 175). Neutrophile werden außer durch apoptotische Zellen auch durch von Makrophagen produziertes IL-1 und TNF- $\alpha$  angelockt (176). Daher haben einige Autoren ein Modell vorgeschlagen, in dem Bakterien auf der Oberfläche von Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Leber, gebunden werden. Daraufhin werden Neutrophile angelockt, welche die Bakterien extrazellulär abtöten. So könnten die meisten Listerien daran gehindert werden, Hepatozyten zu infizieren (173).

In der späten Phase der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* (ab Tag 3) werden spezifische T-Zellen gebildet (177). Allerdings ist ihre Bedeutung bei der Abwehr einer Primärinfektion umstritten (167, 177). So zeigen MHC I- oder II- knockout-Mäuse, denen CD8<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen fehlen, nur eine leicht erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer primären Listerien-Infektion (178, 179). Auch Perforin- oder Fas-defiziente sowie Perforin/Fas-doppelt-negative Mäuse sind in der Lage, eine Primärinfektion, wenn auch teils mit deutlicher zeitlicher Verzögerung, zu beseitigen (180, 181). In SCID-Mäusen, die keine T-Zellen besitzen, wurde allerdings gezeigt, daß das angeborene Immunsystem zwar zunächst die Infektion unter Kontrolle hält, jedoch die Listerien nicht vollständig beseitigen kann. So kann sich eine chronische Infektion ausbilden (182). Anscheinend kann das Fehlen einzelner T-Zell-Subpopulationen (CD4 oder CD8) bzw. ihrer Funktionen (Perforin oder Fas-vermittelte Zellyse) durch die jeweils komplementäre T-Zell-Population in gewissem Maße ausgeglichen werden.

Dagegen sind die Zytokine IFN- $\gamma$  (183, 184) und TNF- $\alpha$  (167, 185, 186) bei einer Primärinfektion unerlässlich für die Beseitigung der Listerien. Diese proinflammatorischen Zytokine aktivieren phagozytische Zellen, welche daraufhin die Bakterien effizienter abtöten. Insgesamt ist der Anteil der adaptiven Immunantwort an der Beseitigung einer Primärinfektion wohl davon abhängig, wie effizient die Listerien von unspezifischen Mechanismen unter Kontrolle gehalten werden. Bei einer sekundären Infektion mit *L. monocytogenes* hingegen spielen T-Zellen eine zentrale Rolle (167). Dabei ist allerdings zu beachten, daß in experimentellen Systemen zur Untersuchung der sekundären, spezifischen Immunantwort gegen Listerien mit höheren Bakterienzahlen gearbeitet wird, die vom angeborenen Immunsystem allein nicht mehr beseitigt werden können. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind hier die wichtigsten Effektorzellen, während die Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen umstritten ist und  $\gamma\delta$  T-Zellen eine untergeordnete Rolle spielen (178). In Übereinstimmung hiermit konnte *in vivo* die Lyse infizierter Hepatozyten und Makrophagen durch zytotoxische T-Zellen gezeigt werden (187). Die zytotoxischen T-Zellen vermitteln sowohl über Perforin- als auch Fas-abhängige Effekte Protektion (180, 181), wobei jeder der beiden Mechanismen allein ausreichend ist. Der Ausfall beider Wege der Zellyse hat eine beträchtlich verminderte Resistenz gegenüber sekundären Listerien-Infektionen zur Folge (181). Durch die Produktion von IFN- $\gamma$  könnten CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch Makrophagen aktivieren (167, 188), allerdings waren in Transfer-Experimenten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus IFN- $\gamma$  knockout-Mäusen protektiv (184). Im Normalfall dürften beide Mechanismen eine Rolle spielen. Durch TNF- $\alpha$  rekrutierte Neutrophile sind, wie in naiven Mäusen, auch bei der sekundären Immunantwort essentiell (189-192).

Eine Reihe listerieller Antigene, die durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden, wurden in der Maus bereits charakterisiert. Interessanterweise scheinen nur sekretierte Proteine wie LLO (193), p60 (194) und IrpA (195) als Quellen für protektive Antigene zu dienen, während gegen nicht-sekretierte Antigene wie z.B. ActA zwar zytotoxische T-Zellen generiert werden, diese aber nicht protektiv sind (196). Dies wurde besonders eindrucksvoll in Experimenten bestätigt, in denen rekombinante Salmonellen das LLO- oder das ActA-Gen Plasmid-kodiert trugen und als Vehikel für genetische Immunisierung gegen *L. monocytogenes* eingesetzt wurden. Während beide Stämme spezifische CTL induzierten, vermittelten nur Salmonellen, die das LLO-Gen trugen, Protektion (197). Dasselbe Muster zeigt sich mit rekombinanten Listerien, die mit dem Gen für ein sekretiertes oder zytosolisches Modell-Antigen transformiert wurden (198) und mit rekombinanten Salmonellen, welche LLO oder p60 jeweils in sekretierter oder nicht-sekretierter Form exprimieren (199). Dieses Phänomen könnte mit den verschiedenen Zelltypen erklärt werden, die durch Listerien infiziert werden. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen sind in der Lage, sowohl sekretierte als auch nicht-sekretierte Antigene dem MHC I-Prozessierungsweg zuzuführen und dementsprechend zytotoxische T-Zellen mit Spezifität für beide Antigen-Typen zu stimulieren. Hepatozyten hingegen besitzen keine ausreichenden Mechanismen der Antigen-Prozessierung und präsentieren nur sekretierte Antigene, die von zytosolischen Listerien in

hohen Mengen produziert werden. Daher werden sie nur durch CTL lysiert, welche für solche sekretierten Antigene spezifisch sind. Infolgedessen vermitteln auch nur diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die durch sie erkannten Antigene Protektion (200).

Neben klassischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitopen wurden auch einige listerielle Antigene identifiziert, die durch nicht-klassische MHC I-Moleküle präsentiert und durch spezifische CTL erkannt werden. Dazu gehören formylierte Peptide, die von Membran-gebundenen listeriellen Proteinen stammen und auf H2-M3 geladen werden (201-204). Dabei wird vermutlich ein Prozessierungsweg benutzt, der eher für exogene Antigene typisch, also nicht vom zytosolischen Vorkommen der Listerien abhängig ist (205). CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die solche Epitope erkennen, besitzen häufig auch Kreuzreaktivität zu anderen Gram-positiven und -negativen Bakterien (205). Zusätzlich wurden nach experimentellen Listerien-Infektionen Qa-1-restringierte CTL beschrieben (47). Qa-1 gehört ebenfalls zu den nicht-klassischen MHC I-Molekülen. Im Gegensatz zu H2-M3 ist der Ligand für Qa-1 noch nicht identifiziert worden; allerdings scheint für seine Prozessierung das zytosolische Vorkommen der Listerien essentiell zu sein, so daß der Prozessierungsweg dem der klassischen MHC I-Moleküle ähneln dürfte (47). Bisher konnte bei diesen durch nicht-klassische MHC I-Moleküle restringierten CTL noch keine protektive Funktion gezeigt werden. Allerdings legt die Tatsache, daß zumindest Qa-1-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen hohen Anteil der gesamten Listerien-spezifischen CTL ausmachen (47), diese Vermutung nahe.

In welchem Maße außer CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch andere T-Zell-Populationen zur Protektion beitragen, ist umstritten (177, 182). Bei einer Primärantwort werden neben spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen generiert (177), die hauptsächlich der T<sub>H</sub>1-Subpopulation angehören. Sie sind bei Infektionen verantwortlich für die Bildung von Granulomen, welche große Mengen Makrophagen und Granulozyten enthalten, sowie für die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und IL-2 (206, 207) und, in experimentellen Situationen, für DTH-Reaktionen. *In vitro* konnten gereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen infizierte Ziellzellen lysieren (208), und in Transfer-Experimenten vermittelten sie einen gewissen Schutz (209-211). Die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat in Infektions-Experimenten jedoch kaum einen Effekt (212). Umgekehrt vermitteln gereinigte CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine gute Protektion, während die durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte DTH keine direkte toxische Wirkung auf Listerien zu besitzen scheint (177). Einige Autoren räumen diesen Zellen allerdings bei der Beseitigung einer Listerien-Infektion eine ähnlich wichtige Funktion ein wie zytotoxischen T-Zellen (213), und in MHC I-defizienten Mäusen scheinen sie bei Sekundärinfektionen zumindest eine teilweise Protektion zu vermitteln (179). Insgesamt ist jedoch die protektive Funktion zytotoxischer T-Zellen besser belegt als die der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Eine regulatorische Funktion bei Listerien-Infektionen wird CD1d-restringierten NK T-Zellen zugeschrieben. Sie kommen in der Leber mit relativ hoher Frequenz vor und produzieren sehr früh nach einer

Infektion IL-4. Dadurch werden vermutlich Makrophagen zur Produktion des Chemokins MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) angeregt, das weitere Monozyten an den Infektionsherd anlocken könnte. Die IL-4-Produktion durch diese T-Zellpopulation wird allerdings sehr bald durch IL-12 heabreguliert. Auf welche Weise dies geschieht, ist unklar. Ebenso ist das Antigen, das diese Zellen erkennen, unbekannt. Allerdings konnte die Expression von CD1d sowohl auf Hepatozyten als auch auf Kupffer-Zellen nachgewiesen werden (87, 88).

Auch  $\gamma\delta$  T-Zellen des Peritoneums, des Darmepithels und der Leber sind an der Immunantwort gegen Listerien beteiligt. Im Peritoneum erhöht sich die Zahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach einer Listerien-Infektion, aber auch nach einer Reihe anderer bakterieller Stimuli (214, 215). Die Depletion dieser Zellen beeinträchtigt die primäre, aber nicht die sekundäre Immunantwort gegen Listerien. In diesen Experimenten konnte auch ein protektiver Einfluß von  $\alpha\beta$  T-Zellen während einer Primärinfektion gezeigt werden (214) (vgl. S.28). Im Darmepithel produzieren  $\gamma\delta$  T-Zellen nach einer oralen Listerien-Infektion IFN- $\gamma$  (216) und in der Leber könnten sie an der Kontrolle der inflammatorischen T-Zell-Antwort beteiligt sein (217). Insgesamt sind die verfügbaren Daten zur möglichen Funktion dieser Zellen in der Listeriose jedoch noch sehr spärlich und teilweise widersprüchlich.

Spezifische Antikörper scheinen keine protektive Funktion gegen *L. monocytogenes* zu vermitteln. Vermutlich sind die Listerien aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise weitgehend vor deren Wirkung geschützt. Dementsprechend ist Immuneserum nicht protektiv (218) und Mäuse, die keine B-Zellen besitzen, zeigen keinerlei verminderte Resistenz gegenüber Listerien-Infektionen (177). Unklar ist, inwieweit Antikörper die Kolonisierung des Darms und den Übertritt der Listerien aus dem Darm in den Körper beeinflussen, da in sämtlichen Infektionsexperimenten mit intravenös injizierten Listerien gearbeitet wurde.

### 1.4.3 Beeinflussung der T-Helfer-Antwort durch *L. monocytogenes*

Viele Pathogene haben Mechanismen entwickelt, die Immunantwort des Wirtes negativ zu beeinflussen. Unter anderem inhibieren viele Viren die MHC I-abhängige Antigen-Prozessierung (122, 219). Mit Trypanosomen infizierte Makrophagen sind in der MHC II-anhängigen Antigen-Präsentation gestört (220) und der extrazelluläre Erreger *Helicobacter pylori* inhibiert diesen Prozessierungsweg mit Hilfe eines Toxins (221). Da Listerien nach ihrer Aufnahme durch Makrophagen das Phagosom mit Hilfe des Hämolysins LLO zerstören (152), lag die Vermutung nahe, daß dadurch die MHC II-abhängige Antigen-Prozessierung gestört wird. Tatsächlich lagen schon früh Berichte vor, daß *L. monocytogenes*-infizierte Makrophagen eine verringerte Kapazität, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren, aufweisen (222, 223). Hierfür

ist LLO verantwortlich (223, 224). Ursprünglich wurden diese Daten so interpretiert, daß LLO generell die Prozessierung stört (223). Jedoch konnte später ein durch LLO induzierter Antagonismus gezeigt werden, der zur Anergisierung spezifischer T-Zellen führt. Die Anergisierung durch Antigen, das nach LLO-Behandlung der APC prozessiert wurde, findet selbst in Anwesenheit stimulatorischer Peptide statt (224, 225). Es sind jedoch nicht alle T-Zell-Funktionen betroffen. Inhibiert werden nur die Proliferation und die Produktion von IL-2, während die IFN- $\gamma$ - und IL-3-Produktion bestimmter T-Zell-Linien nicht beeinträchtigt ist (A. Darji, unveröffentlicht). Die Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch LLO besitzt also Merkmale eines partiellen Antagonismus. Sie ist im Maussystem unabhängig von den verwendeten APC (225) und ist besonders ausgeprägt bei Epitopen, deren Präsentation von Ii abhängig ist, also solchen, die auf neusynthetisierte und nicht auf recycelte MHC II-Moleküle geladen werden (vgl. 1.3.3) (226). Eine ähnliche Ii-Abhängigkeit wurde auch für die Inhibierung der Antigen-Präsentation durch das VacA-Toxin aus *Helicobacter pylori* beschrieben (221). Der Mechanismus der veränderten Antigen-Prozessierung durch LLO ist bisher noch nicht aufgeklärt.

## 1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* wurde bisher fast ausschließlich im Mausmodell charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb einige Aspekte der Interaktion von *L. monocytogenes* mit dem humanen Immunsystem untersucht werden. Dabei wurden drei Fragestellungen bearbeitet:

### 1.5.1 Die spezifische humorale Immunantwort

Obwohl spezifische Antikörper bzw. B-Zellen im experimentellen Maussystem keine Protektion gegen Listerien zu vermitteln scheinen (177, 218), wurde in Listeriose-Patienten die Bildung LLO- und p60-spezifischer sowie weiterer, gegen nicht identifizierte Listerien-Antigene gerichteter Antikörper beschrieben (227-231). Außerdem beeinflußt der Rezeptor, mit dessen Hilfe Listerien Makrophagen infizieren, deren Fähigkeit, intrazelluläre Bakterien abzutöten. Aufnahme Komplement-bedeckter Listerien über den C3-Rezeptor führt zu deren Abtötung, während Listerien, die über Fc-Rezeptoren aufgenommen werden, überleben (232, 233). Da Listeriose hauptsächlich in immunsupprimierten Personen auftritt, sollte die Antikörperantwort gegen Listerien im normal funktionierenden Immunsystem untersucht werden, d.h. in gesunden Individuen, bei denen besonders häufiger Kontakt zu Listerien vermutet wurde. Zum Vergleich wurden Listeriose-Patienten herangezogen.

### 1.5.2 Inhibition der MHC II-abhängigen T-Zell-Stimulierung

Die aktive Inhibition Helfer-T-Zell-abhängiger Funktionen durch *L. monocytogenes* könnte dem Erreger einen entscheidenden Vorteil in der Pathogenese verschaffen. Bisher wurden solche Effekte aber nur im experimentellen Maussystem beschrieben. Es sollte daher geklärt werden, inwieweit Listerien in der Lage sind, im humanen Immunsystem die Antigen-Präsentation durch unterschiedliche APC sowie die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu beeinflussen. Dies war auch eine wichtige Fragestellung im Hinblick auf Versuche, rekombinante Listerien als Lebendimpfstoffe einzusetzen. In der Maus wurden solche Listerien bereits erfolgreich zur Induktion zytotoxischer T-Zellen gegen Viren und Tumore eingesetzt (200, 234-238). Dazu war allerdings die intrazelluläre Vermehrung und damit die Expression von funktionellem LLO Voraussetzung. Außerdem wurde gereinigtes LLO als Carrier genutzt, um zytotoxische T-Zellen gegen Passagier-Proteine zu generieren (239-242). Da Listerien, bevor sie in das Zytosol entkommen, das Phagosom und somit den Prozessierungsweg für MHC II-abhängige Antigene passieren, könnten sie auch eingesetzt werden, um gleichzeitig spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren. Eine Inhibition von CD4<sup>+</sup> T-Zellen würde aber einer generellen Anwendbarkeit entgegenstehen.

### 1.5.3 Stimulation CD1-restringierter DN T-Zellen durch Listerien

T-Zellen, die durch nicht-klassische MHC-Moleküle bzw. durch CD1 restringiert sind, scheinen in der frühen Phase der Immunantwort gegen Pathogene eine Rolle zu spielen. Sie erkennen im Gegensatz zu klassischen T-Zellen Strukturen, die charakteristische Bestandteile verschiedener Bakteriengruppen sind. Zusätzlich sind die Antigen-präsentierenden Moleküle (CD1 oder MHC Ib) nicht polymorph. Solche T-Zellen stehen daher an der Grenze zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Im Menschen wurden CD1-restringierte T-Zellen, die Zellwandbestandteile von Mycobakterien erkennen, aus gesunden Spendern isoliert (vgl. Kap. 1.2.2.2). Solche Strukturen, z.B. Lipoteichonsäuren, finden sich zum Teil auch in anderen Gram-positiven Bakterien (102). In der Maus wird für CD1d-restringierte NK T-Zellen eine regulatorische Funktion bei der Immunantwort gegen Listerien angenommen (88), und spezifische Qa-1-restringierte T-Zellen scheinen einen wichtigen Bestandteil der zytotoxischen Effektorzellen auszumachen (47). Es wäre daher möglich, daß auch bei der humanen Immunantwort gegen Listerien solche T-Zellen eine Rolle spielen. Im Menschen finden sich CD1a-c hauptsächlich auf dendritischen Zellen, welche eine zentrale Funktion bei der Aktivierung spezifischer T-Zellen, auch im Verlauf bakterieller Infektionen, einnehmen. Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Präsentation listerieller Antigene durch CD1 und die Stimulation der entsprechenden DN T-Zellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeines

Die meisten benutzten Puffer und Lösungen (PBS, TBS etc.) sind allgemeiner Standard in molekularbiologischen und biochemischen Laboratorien. Sie wurden gemäß (243) angesetzt oder (z.B. im Fall von Zellkulturmedien) fertig vom Hersteller bezogen und finden sich deshalb nur im Verzeichnis der Abkürzungen (6.1) mit Referenz oder Angabe des Herstellers. Ebenso wird hier auf biochemische und molekularbiologische Standardmethoden wie ELISA, SDS-PAGE, Färbungen, Restriktionsverdau usw. nicht im Detail eingegangen. Nur Änderungen der Standardprotokolle laut (243), spezielle Reagenzien (z.B. Antikörper, Restriktionsenzyme usw.) sowie besondere Methoden werden im folgenden beschrieben.

### 2.2 Seren

Gesunden Spendern wurde Blut entnommen und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Entnahme des Agglutinats mit einer Pinzette wurde das Serum zentrifugiert (5 Minuten, 1000 x g), der klare Überstand entnommen, aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Spender A hatte über einen langen Zeitraum mit großen Mengen von Kultur-Überständen von *L. monocytogenes* gearbeitet, während Spender C, F, H, I, J, L, M und O kontinuierlich mit kleineren Mengen verschiedener Listerien-Spezies gearbeitet hatten. Bei den Donoren B und D wurde ein früherer Kontakt mit Listerien vermutet. B hatte mit Saatgut gearbeitet, während D praktizierender Veterinär war. Für Donoren E, G und K war kein Kontakt mit Listerien bekannt. Seren von Listeriose-Patienten wurden bereitgestellt von K. Notermans, Rijksinstituut voor Volksgezondheid, Niederlande. Seren von zufällig ausgewählten Spendern stammten aus Blutkonserven, die von der Blutbank Springe bezogen wurde. Sie fielen als Nebenprodukt bei der Isolierung von peripheren Blutzellen an.

### 2.3 Antikörper

#### 2.3.1 Sekundäre Antikörper für Immunoblot und ELISA

Als Sekundärantikörper wurden folgende affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper der Firma



Dianova benutzt: Ziege-anti-human IgG (h oder h+l); Ziege-anti-human IgA (h); Ziege-anti-Maus IgG (h+l); Kaninchen-anti-human IgG (Fc $\gamma$ ); Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-gekoppelt.

### 2.3.2 Primäre Antikörper für Immunoblot und ELISA

**IC87C8D10:** spezifisch für p60 aus *L. monocytogenes* (Maus-IgG; monoklonal); eingesetzt in Immunoblots als ungereinigter Kulturüberstand des Hybridoms (Verdünnung 1:100). Freundlicherweise bereitgestellt von A. Lingnau.

**Fu p60.21.14:** spezifisch für p60 aus *L. monocytogenes* (Maus-IgG; monoklonal). Dieser Antikörper wurde durch Immunisierung von Mäusen mit in dieser Arbeit gereinigtem p60 und nachfolgende Etablierung von B-Zellhybridomen hergestellt. Er wurde in gereinigter Form im Sandwich-ELISA als Fangantikörper benutzt. Die Immunisierung der Mäuse, Herstellung der B-Zellhybridome und Reinigung des Antikörpers wurde von Susanne zur Lage und Regina Lesch, beide GBF, Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie, durchgeführt.

**Kaninchen-anti-p60:** spezifisch für p60. Polyklonales Serum aus mit p60 immunisierten Kaninchen. Das Serum wurde von der Firma Eurogentec (Brüssel) hergestellt. Der Antikörper wurde in gereinigter Form als Nachweisantikörper für p60 im Sandwich-ELISA benutzt.

### 2.3.3 Antikörper für Zytofluorimetrie und Auftrennung von Zellen

Antikörper wurden für die Durchflußzytometrie je nach Anforderung gekoppelt an FITC oder PE oder biotinyliert eingesetzt. Im letzteren Fall wurde in einem zweiten Schritt mit Streptavidin-PE nachgefärbt. Teilweise wurden ungekoppelte Antikörper benutzt, die mit geeigneten FITC- oder PE-gekoppelten Sekundärantikörpern (polyklonal) markiert wurden. Alle Antikörper wurden vor Gebrauch zur Bestimmung der optimalen Konzentration ausstitriert. Ein Teil der benutzten Antikörper stammte von den nachfolgend aufgezählten B-Zell-Hybridomen und wurde entweder als ungereinigter Zellüberstand oder nach Reinigung über Protein G und evtl. nachfolgender Kopplung an Biotin oder FITC (beides durchgeführt von S. zur Lage und R. Lesch, GBF) eingesetzt.

Die Linien 6D10 (Maus-anti-human **CD4**), OKT8 (Maus-anti-human **CD8**), TR66: (Maus-anti-human **CD3**) und 63D3 (Maus-anti-human **CD14**) wurden von Dr. P. Dellabona zur Verfügung gestellt. Alle Antikörper gehörten zur IgG-Klasse.

Folgende monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenantigene wurden gekauft:

anti-CD1a	Klon B17.20.9; mIgG2a (Immunotech)
anti-CD1b	Klon 4.A7.6; mIgG2a (Immunotech)
anti-CD1c	Klon L161; mIgG1 (Immunotech)
anti-CD80 (B7-1)	Klon BB1; mIgM (Pharmingen)
anti-CD86 (B7-2)	Klon IT2.2; mIgG2 (Pharmingen)
anti-CD19	Klon B43; mIgG1; FITC-gekoppelt (Pharmingen)
anti-CD3	Klon CRIS-7; mIgG2a; PE-gekoppelt (Biosource)
anti-CD8 $\alpha$	Klon 143-44; mIgG1; PE-gekoppelt (Biosource)

## 2.4 Antigene für Immunoblot und ELISA

Listeriolysin O (**LLO**) wurde von H. Herrmann (AG Molekulare Immunologie, GBF) wie beschrieben gereinigt (244). Internalin B (**InlB**), **IrpA** (153) und **ActA** wurden jeweils von S. Müller, A. Lingnau und J. Wissing gereinigt und freundlicherweise bereitgestellt. Die Reinigung von **p60** ist in dieser Arbeit gesondert beschrieben (3.3).

### 2.4.1 Präparation listerieller Zellwand- und Überstandsproteine

Listerien wurden in BHI-Medium (Difco, Detroit, Mich USA; angesetzt nach Angaben des Herstellers) oder auf BHI-Agarplatten kultiviert. Für die Isolierung von Proteinen aus Flüssigkulturen wurde das Medium vor Gebrauch über einen Gegenstromfilter mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa (Minitan; Millipore) filtriert, um die im BHI vorhandenen Proteine auszuschließen. Zellwandextrakte und Überstandsproteine wurden gemäß (245) wie folgt präpariert: Übernacht-Kulturen (1l) von *Listeria spec.* wurden zentrifugiert (10 Minuten, 9000 x g). Um Zellwand-Proteine zu erhalten, wurde das Zellsediment einmal mit PBS gewaschen, in 1,3 ml PBS + 2 % SDS aufgenommen und 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten, 10.000 x g) wurde der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 70 °C gelagert. Für die Isolierung von Überstandsproteinen wurde der Kulturüberstand mit 10 % TCA versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 Minuten, 10.000 x g) wurden die gefällten Proteine in 300  $\mu$ l 2xSDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Dabei wurde zunächst stufenweise 1 M Tris pH 8,9 zugegeben, um die TCA zu neutralisieren (kontrolliert mit Hilfe des pH-Indikators im Probenpuffer) und die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Die aufgenommenen Überstands-Proteine wurden 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, aliquotiert und bei - 70 °C gelagert.

## 2.5 Immunoblots

Proteinextrakte aus *Listeria spec.* (aufgetragene Mengen visuell abgeglichen) oder gereinigte Proteine (1 µg/Spur) wurden in der SDS-PAGE (243) (10 % oder 12 % Polyacrylamid-Mix) aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Semi-dry Blotsystems (Phase, Lübeck) auf Nitrocellulose-Filter (Sartorius, Göttingen) übertragen (30 Minuten bei 50 mA; Transfer-Puffer: 192 mM Glycin, 20 mM Tris-Base, 10 % Methanol, pH 8,2). Die Effizienz des Transfers wurde durch anschließende Anfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue (243) überprüft. Nach Absättigung des Filters (TTBS + 0,1 % Casein) wurde dieser mit humanem Serum (Verdünnung 1:10.000) oder, in einigen Fällen, mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Kulturüberstände, Verdünnung 1:100) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte in zwei Schritten mit Hilfe geeigneter polyklonaler, biotinylierter Sekundärantikörper (alle Dianova, Verdünnung 1:2000) und Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase (Sigma, Verdünnung 1:2000). Der Blot wurde anschließend mit NBT/BCIP entwickelt.

Um humane Seren auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen listerielle Zellwand- oder Überstandsproteine zu untersuchen, wurden in einigen Versuchen präparative Gele verwendet. Diese wurden geblottet und die Filter in eine Streifenblotkammer (Miniblotter MN28, Biometra, Göttingen) eingespannt, welche die Anfärbung eines Filters mit mehreren unterschiedlichen Seren erlaubt. In diesem Fall wurden 75 µl Serum (Verdünnung 1:500) eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen der eingespannten Filter wurden diese entnommen und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

### 2.5.1 NBT/BCIP-Färbung

BCIP-Stammlösung: 50 mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, Sigma, Deisenhofen) in 100 % DMF (Dimethylformamid)

NBT-Stammlösung: 50 mg/ml NBT (Nitroblue Tetrazolium, Sigma, Deisenhofen) in 70 % DMF

Lagerung bei -20 °C

Die Färbelösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt. Zunächst wurden 66 µl der NBT-Stammlösung, danach 34 µl der BCIP-Stammlösung in 10 ml Substratpuffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8) verdünnt. Die Entwicklung der Banden wurde durch Waschen des Blots mit H<sub>2</sub>O gestoppt.

## 2.6 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

ELISA-Platten (Maxisorp, Nunc) wurden bei 4 °C über Nacht mit Antigen beschichtet (0,5 µg/ml in 100 µl Beschichtungspuffer (0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6)). Die Absättigung erfolgte mit PBS + 1 % BSA. Für alle Waschschrte sowie zur Verdünnung der Antikörper und Enzyme wurde Verdünnungspuffer (PBS + 0,1 % Tween 20 + 1 % BSA) benutzt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (meist humanes Serum) erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper in 2 Schritten mit Hilfe biotinylierter Sekundärantikörper (wie im Immunoblot) und Streptavidin-gekoppelter Peroxidase plus OPD (ortho-Phenylendiamin) als Substrat. 1 mg/ml OPD wurden in Substratpuffer (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,1 M Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 5,0) gelöst und danach 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %ig) pro 10 ml Substratlösung zugegeben. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Substratlösung gestartet und nach Bedarf mit 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 490 nm ohne Referenz-Filter mit Hilfe eines ELISA-Readers (MR5000, Dynatech).

Zur Bestimmung des spezifischen IgG- oder IgA-Titers im Serum wurde dieses seriell verdünnt eingesetzt. Der biotinylierte Sekundärantikörper (Ziege-anti-humanIgG oder IgA) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 und die Streptavidin-gekoppelte Peroxidase 1:100.000 verdünnt eingesetzt. Unter diesen Bedingungen (Sekundärantikörper und Peroxidase in limitierender Menge) ergab sich eine sigmoide Färbungskurve. Der Antikörper-Titer wurde aus der reziproken Verdünnung des Serums bestimmt, welche eine halbmaximale Farbreaktion ergab.

### 2.6.1 Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA wurde zur Bestimmung der Ausbeute bei der Reinigung von p60 benutzt. Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) wurden über Nacht mit dem Fangantikörper Fu p60.21.14 (Kap. 2.3.2; 0,5 µg/ml, 100 µl/well) gecoatet. Nach Absättigung mit 1 % BSA in PBS wurden die Proben bzw., als Standard, gereinigtes p60 (ab 200 µg/ml) zugegeben und seriell verdünnt. Als Nachweisantikörper diente Kaninchen-anti-p60-Antiserum (2.3.2) in einer Verdünnung von 1:1000 und als Sekundärantikörper wurde Ziege-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt (Dianova, Verdünnung 1:1000), zugegeben. Der ELISA wurde mit OPD, wie unter 2.6 beschrieben, entwickelt. Die p60-Konzentrationen in den verschiedenen Proben wurden mit Hilfe der Auswertungs-Software (Biolinx 2.1, Dynatech) des ELISA-Readers (MR5000, Dynatech) berechnet.

## 2.7 Bestimmung von Protein-Konzentrationen

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Micro BCA protein assay reagent kit (Pierce, USA) nach Angaben des Herstellers mit BSA als Standard. Dabei handelt es sich um eine Modifikation des Protein-Nachweises nach Lowry (246). Aufgrund der Interaktion reduzierender Agenzien (z.B. Bicin oder DTT) mit Bestandteilen dieses Kits wurden, z. B. bei der Bestimmung der Konzentration von p60, gegen PBS dialysierte Proben verwendet. In einigen Fällen, so z.B. bei der Bestimmung der Konzentration von LLO mit zugesetztem DTT, wurde stattdessen ein modifizierter Protein-Nachweis nach Bradford verwendet (Bio-Rad, Deutschland). Auch hier diente BSA als Protein-Standard. Beide Protein-Nachweise wurden in Mikrotiterplatten angesetzt und die Farbreaktion in einem ELISA-Reader (Dynatech) bei 560 nm (Micro BCA) bzw. 590 nm (Bradford) gemessen.

## 2.8 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen wurde nach Heukeshoven und Dernick durchgeführt (247).

- Lösung 1: 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure
- Lösung 2: 20 % Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % Glutardialdehyd, 0,2 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- Lösung 3: 0,1 %  $\text{AgNO}_3$ , 0,02 % Formaldehyd
- Lösung 4: 2,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,01 % Formaldehyd, pH 11,3-11,8
- Lösung 5: 0,05 M EDTA

Das Gel wurde für 10 Minuten in Lösung 1 fixiert, 10 Minuten lang in Lösung 2 inkubiert und 3 mal mit  $\text{H}_2\text{O}$  (je 10 min) gewaschen. Danach wurde das Gel 10 Minuten lang in Lösung 3 getränkt und in Lösung 4 entwickelt. Die Entwicklung wurde mit Lösung 5 gestoppt.

## 2.9 Listerien-Stämme

Folgende Listerien-Stämme wurden in dieser Arbeit für die Untersuchung der spezifischen humoralen Immunantwort benutzt: *L. innocua*, *L. monocytogenes* EGD pERL50-1 *prfA* 7973 sowie die Mutanten  $\Delta\text{hly}2$  (248),  $\Delta\text{hly}2 + \text{prfA}7973$  und *irpA2*<sup>-</sup>. Das Multicopy-Plasmid pERL50-1 *prfA* 7973 (249) enthält das *prfA*-Gen von *L. monocytogenes* NCTC7973. Mit diesem Plasmid transformierte Listerien exprimieren verstärkt Virulenz-Faktoren, die durch das Genprodukt von *prfA* kontrolliert werden. Der Stamm *L. monocytogenes irpA2*<sup>-</sup> exprimiert aufgrund einer Transposon-Insertion im *irpA*-Gen das

entsprechende Protein nicht mehr. Für Infektionsexperimente wurden die Stämme *L. innocua*, *L. monocytogenes* EGD (250), *L. m.*  $\Delta$ hly2, *L. m.*  $\Delta$ irpA2, *L. m.*  $\Delta$ inlAB (251) sowie die isogene Mutante *L. m.* LLO492A benutzt. Für einige dieser Experimente, bei denen die Infektion im Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden sollte, wurden *L. monocytogenes* sowie die Mutante  $\Delta$ hly2, transfiziert mit dem Vektor pERL-3cspl:GFP, eingesetzt. Alle Listerien-Stämme wurden von T. Chakraborty (Medizinische Mikrobiologie, Gießen) bereitgestellt. Listerien wurden in filtriertem (Ausschlußgröße 10 kDa) BHI-Medium (Difco laboratories, Detroit, Michigan USA) kultiviert. Transformanten sowie die Insertionsmutante *irpA2*<sup>-</sup> wurden in Gegenwart von 5 µg/ml Erythromycin kultiviert.

## 2.10 Hyperexpression, Reinigung und Charakterisierung von p60

### 2.10.1 Konstruktion von p60-Hyperexpressionsstämmen

Die p60-Sequenz (EMBL-Zugriffsnummer X52268) inklusive Signalsequenz und Terminator wurde mittels PCR aus dem Plasmid pLM37 (freundlicherweise bereitgestellt von B. Gerstel, GBF) amplifiziert. Dabei wurden 5' eine NdeI-Schnittstelle sowie 3' eine SpeI-Schnittstelle eingefügt. Folgende Primer wurden benutzt: sense: 5'-GCGCGCCATATGAATATGAAAAAGCAACTATCGC-3' (enthält eine NdeI-Schnittstelle), antisense: 5'-CGCGCGACTAGTAACCTGTGAAGCGAACTGC-3' (enthält eine SpeI-Schnittstelle). Um das Risiko der Einführung von Mutationen zu minimieren, wurde das p60-Gen mit Pfu-Polymerase amplifiziert, welche Proofreading-Funktion besitzt (Hot Start; 30 Zyklen; Denaturation: 1 Minute, 94 °C, Annealing: 2 Minuten, 60 °C, Extension: 4 Minuten, 72 °C). Das PCR-Produkt wurde zunächst "blunt end" in den Vektor pCR-Script<sup>TM</sup> Amp SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Vorschrift des Herstellers ligiert und anschließend sequenziert, um Mutationen durch die PCR auszuschließen. Danach wurde das p60-Gen mit NdeI/SpeI herausgeschnitten und in das Plasmid pEP2 (geöffnet mit NdeI/XbaI; die geöffneten SpeI- und XbaI-Schnittstellen sind kompatibel) ligiert. pEP2 (konstruiert und freundlicherweise bereitgestellt von B. Gerstel, GBF) besitzt zur Expression von Proteinen in Listerien den ActA-Promotor 5' vor der "multicloning site". Der Promotor wird positiv reguliert vom gleichfalls auf pEP2 kodierten *prfA*-Genprodukt. Das resultierende Plasmid, pEP2-p60, wurde zunächst in *E. coli* TG2 elektroporiert, um größere Mengen des Plasmids reinigen zu können (Plasmid Maxi Purification kit, Gibco). Zur Produktion von p60 wurde *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2 oder *L. monocytogenes*  $\Delta$ VGC mit pEP2-p60 transformiert. Bei *L. monocytogenes*  $\Delta$ VGC (bereitgestellt von T. Chakraborty, Uni Giessen) ist das gesamte Virulenz-Gencluster deletiert. Beide Hyperexpressionsstämme wurden in filtriertem (Ausschlußgröße 10.000 Da) BHI + 5 µg/ml Erythromycin kultiviert.

### 2.10.2 Reinigung von p60

4,5 l filtriertes BHI mit 5 µg/ml Erythromycin wurden mit 45 ml einer Übernacht-Kultur von *L. monocytogenes* Δhly2 pEP2-p60 oder ΔVGC pEP2-p60 angeimpft. Die Bakterien wurden 8-10 Stunden auf einem Schüttler bei 37 °C und 150 rpm kultiviert und dann durch Zentrifugation (4 °C, 6000 x g, 10 Minuten) abgetrennt. Daraufhin wurde der Kulturüberstand mit Hilfe eines Gegenstromfilters (Millipore, Ausschlußgröße 10.000 Da) bei gleichzeitiger Kühlung auf Eis ca. 60-fach auf ein Volumen von ungefähr 100 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 10 Minuten, 4000 x g), sterilfiltriert (0,8 µm) und in 16 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

P60 wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch Gelfiltration und Kationenaustauschchromatographie mit Hilfe eines FPLC-Systems (Pharmacia) gereinigt. Für die Gelfiltration, die hauptsächlich der Entfernung der im BHI enthaltenen kleineren Moleküle sowie von Proteinen < 30 kDa diente, wurden einem 16 ml-Aliquot des Konzentrates 4 ml 5 M NaCl zugesetzt (Endkonzentration 1 M NaCl), woraufhin es auf eine Sephadex G-50 "coarse"-Säule (Durchmesser 5 cm, Gelvolumen ca. 825 ml) geladen wurde. Als Laufpuffer diente PBS + 1 M NaCl. Die Säule wurde vor jeder Reinigung mit ca. 1 Liter Laufpuffer gespült (Laufgeschwindigkeit 5 ml/min). Die ersten 200 ml nach dem Beladen wurden verworfen, danach wurde der Durchlauf in 10 ml-Fractionen (insgesamt 250 ml) gesammelt und die Säule zur vollständigen Entfernung des BHI mit 1 Liter Laufpuffer nachgespült. Die gesammelten Fractionen wurden in der SDS-PAGE auf das Vorhandensein von p60 getestet. Positive Fractionen wurden vereinigt und gegen 50 mM Ameisensäure, pH 4,0, dialysiert, wobei der Puffer zweimal gewechselt wurde. Eventuell auftretendes Präzipitat wurde durch Zentrifugation entfernt und das Dialysat danach filtriert (0,2 µm). Es hatte nach diesem Schritt ein Volumen von 150 bis 200 ml.

Im zweiten Reinigungsschritt wurde p60 mit Hilfe einer Kationenaustausch-Säule (MonoS HR 16/10, Pharmacia) von anderen Proteinen getrennt. Vor jeder Reinigung wurde die Säule durch abwechselndes Spülen mit je 5 ml 0,5 % SDS, 1 N HCl und 2 M NaOH so lange gereinigt, bis keine Proteine mehr von der Säule gewaschen wurden (Kontrolle des Durchlaufs bei OD<sub>280</sub>). Nach Equilibrierung der Säule mit 40 ml Laufpuffer (50 mM Ameisensäure, pH 4,0) wurde diese bei einer Flußrate von 2 ml/min mit dem Dialysat beladen (aufgrund des hohen Volumens direkt über Pumpe A) und mit Laufpuffer nachgespült, bis die optische Dichte des Durchlaufs wieder auf den Grundwert abgesunken war. Danach wurde sie mit 30 ml Puffer A (50 mM Bicin, pH 8,35) gewaschen. Unter diesen Bedingungen blieb nur p60 am Säulenmaterial gebunden. Die Elution von p60 erfolgte mit Puffer B (Puffer A + 1 M NaCl) ohne Gradient; dabei wurden 2 ml-Fractionen gesammelt, welche in der SDS-PAGE auf p60 getestet wurden. Positive Fractionen wurden gegen PBS dialysiert und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte wie unter 2.7 beschrieben.

Die Lagerung der Säulen erfolgte in 20 % Isopropanol (MonoS) oder PBS + 1 M NaCl + 0,1 M NaOH (Sephadex G 50).

### 2.10.3 Proteinsequenzanalyse

Die N-terminale Ansequenzierung von Proteinen wurde von R. Christ, Instrumentelle Analytik, GBF, durchgeführt. Die zu sequenzierenden Proben wurden zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Naßblotkammer auf eine PVDF-Membran (Mini Pro Blott, Applied Biosystems) transferiert (2 Stunden bei 150 mA bei 4 °C. Transferpuffer: 50 mM Tris, 50 mM Borsäure, pH 8). Der Blot wurde mit Amidoschwarz-Färbelösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,003 % Amidoschwarz) angefärbt und die zu sequenzierende Bande ausgeschnitten. Die Membran mit der geblotteten Probe wurde dann einem automatischen Edmann-Abbau (Procise 473A Sequencer, Applied Biosystems) unterworfen.

Die N-terminale Ansequenzierung des gereinigten p60 ergab die Sequenz STVVVEAGXXLWXIAXS-KGXXVDXIKKAN, welche dem Aminoterminus von p60 ohne Signalpeptid entspricht.

### 2.10.4 Messung der lytischen Aktivität von p60

P60 (auch als IAP, Internalization Related Protein, bezeichnet) ist eine Murein-Hydrolase, welche zur Zellteilung benötigt wird. In einer früheren Arbeit wurde beschrieben, daß *Micrococcus lysodeikticus*-Zellen, welche in Polyacrylamid-Gele eingegossen waren, von elektrophoretisch aufgetrenntem p60 lysiert wurden (159). Um die lytische Aktivität des in dieser Arbeit gereinigten p60 zu prüfen und darüber hinaus den pH-Bereich, in dem p60 arbeitet, bestimmen zu können, wurde eine Abwandlung des in (159) beschriebenen Tests entwickelt, bei dem die lytische Aktivität von p60 in Lösung bestimmt werden konnte.

Gereinigtes p60 wurde in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten in Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) seriell verdünnt (ab 100 µg/ml; 100 µl/well). Folgende Puffer wurden benutzt. PBS (pH7), PBS + 10 mM DTT, 50 mM Ameisensäure (pH4), ELISA Coating buffer (Kap. 2.6; pH9,5), 100 mM Phosphatpuffer (pH5), 100 mM Tris (pH 8). Nach Zugabe von 100 µl Zellen von *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma; lyophilisiert; aufgenommen zu 0,04% in H<sub>2</sub>O) wurden die Platten vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (MR5000, Dynatech) bei 620 nm gemessen. Der Hintergrund des jeweiligen Puffers ohne Zellen wurde abgezogen. Die Zellyse wurde wie folgt errechnet: % Lyse =  $(1 - OD_{620} / OD_{620 \text{ max}}) \times 100$ , wobei  $OD_{620 \text{ max}}$  die optische Dichte der Bakterien nach 4 Stunden ohne Zugabe von p60 darstellt.



## 2.11 Zellkultur

### 2.11.1 Medien, Zusätze, Antigene

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zellen in komplettem RPMI (RPMI (Gibco) mit zugesetztem Glutamin, Na-Pyruvat, nicht-essentiellen Aminosäuren,  $\beta$ -Mercaptoethanol) kultiviert, außerdem wurden 10 % hitze-inaktiviertes FCS (RPMI/FCS) oder 5 % Human-Serum (RPMI/HuS) zugesetzt. Für die Kultivierung dendritischer Zellen wurde FCS mit niedrigem Endotoxin-Gehalt (HyClone) benutzt. Interleukin-2 wurde als konzentrierter Kulturüberstand (10.000 U/ml, freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Paolo Dellabona, Dibit, Mailand) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Als Waschmedium diente RPMI + 1 % FCS ohne weitere Zusätze.

Tetanus-Toxoid (TT) wurde vom Serum-Institut Bern bereitgestellt. LLO wurde von Hanne Herrmann nach (244) gereinigt und bereitgestellt. Phytohämagglutinin (PHA, Boehringer) diente zur Stimulation von T-Zellen bei Klonierung und normaler Kultur. Die synthetisch hergestellten Peptide p2 (TT830-844 QYIKANSKFIGITEL) oder p30 (TT947-967 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) wurden von Dr. A. Lanzavecchia, Basel Institute for Immunology, bereitgestellt. Lysat von *Listeria monocytogenes* wurde aus Übernachtskulturen (200 ml) gewonnen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen, in 50 ml PBS aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (4 Einfrier-/Auftauzyklen). Je 10 ml Lysat wurden im Ultrasonicator (3 Minuten) homogenisiert, 10 Minuten bei 12.000 x g abzentrifugiert und bis zur Verwendung in Aliquots bei -70 °C gelagert.

### 2.11.2 Zellen

Folgende Zellen wurden von P. Dellabona bereitgestellt:

Das humane T-Zell-Lymphom MOLT-4 (ATCC CRL 1582) ist CD1a-c-positiv. Es wurde als Zielzelle für Zytotoxizitätstests mit DN T-Zellen benutzt. C1R Mock, C1R CD1a, C1R CD1b, C1R CD1c wurden zur Identifizierung des Restriktionselements der in dieser Arbeit etablierten DN T-Zellen benutzt. Das Maus-Lymphom C1R war mit CD1a, b, c oder leerem Vektor transfiziert worden. Diese Zellen wurden in RPMI/5% FCS mit 250  $\mu$ g/ml G418 kultiviert.

Zur Beschreibung der in dieser Arbeit etablierten Zelllinien siehe Kap. 2.11.5 (CD4<sup>+</sup> T-Zellklone), Kap. 2.11.7 (EBV-B-Zellen sowie Kap. 3.6 (DN T-Zellen).

### 2.11.3 Isolierung verschiedener Zelltypen aus humanem Blut

Freiwilligen, gesunden Spendern wurden 50-100 ml Blut entnommen. Die Isolierung peripherer Blutzellen (PBMC) erfolgte durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten (Ficoll, Seromed) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden Erythrozyten sowie Granulozyten abgetrennt. Für Experimente, bei denen der HLA des Blutspenders unerheblich war, wurden statt Vollblut angereicherte Lymphozyten-Präparationen ("Buffycoats") von der Blutbank Springe oder der Blutbank des Ospedale San Raffaele (Milano, Italien) bezogen. Zur Isolierung von Monozyten und dendritischen Zellen wurden ca.  $5-10 \times 10^7$  PBMC in 8ml Waschmedium aufgenommen und in Gewebekultur-Petrischalen mit 15 cm Durchmesser 1 bis 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen (größtenteils T-Zellen und B-Zellen) wurden abgewaschen und die adhärenente Zellen in 12 ml RPMI/FCS + 50 ng/ml IL-4 + 50 ng/ml GM-CSF kultiviert. Rekombinantes IL-4 wurde als Überstand der Zelllinie 10.E1.B2 neo h IL-4 (bereitgestellt von Dr. Paolo Dellabona) eingesetzt. Rekombinantes GM-CSF (Leucomax 300) wurde freundlicherweise von der Firma Sandoz bereitgestellt. Nach Inkubation über Nacht lösten sich die Monozyten vom Plastik ab und konnten geerntet werden. Nach 3-5 Tagen entwickelten sich diese Zellen zu dendritischen Zellen. Diese wurden zwischen Tag 5 und 8 der Kultivierung benutzt. Die hier benutzten dendritischen Zellen besaßen einen "unreifen" Phänotyp. Sie waren größtenteils CD1a<sup>+</sup>, CD1b<sup>+</sup>, Cd1c<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD83<sup>-</sup>, B7-1<sup>low</sup>, B7-2<sup>+</sup>.

**B-Zellen** wurden aus der nicht-adhärenenten Fraktion der PBMC isoliert, indem diese zunächst 20 Minuten bei 4 °C mit anti-CD3 (TR66, Maus-anti-human CD3; überlassen von Dr. Paolo Dellabona; 1 µg/10<sup>6</sup> Zellen) inkubiert und dann die markierten T-Zellen mit Hilfe magnetischer Beads (Dynabeads, Ziege-anti-Maus-IgG-gekoppelt; Dynatech, Verhältnis beads zu Zellen 2,5:1) entfernt wurden.

### 2.11.4 Isolierung spezifischer humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellklone

Für die Isolierung spezifischer T-Zellklone wurde gesunden Spendern 20 ml Blut entnommen und die PBMC durch Dichtezentrifugation über Ficoll (Seromed) isoliert. Diese wurden in 24 Loch-Platten (Costar) in 2 ml RPMI/HuS ausgesät ( $2 \times 10^6$ /well) und das gewünschte Antigen (1 µg/ml) zugegeben. Nach 4 bis 5 Tagen wurde dem Medium 5 bis 20 U/ml IL-2 zugesetzt und die Zellen nach Bedarf auf weitere Löcher verteilt. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von jeweils ca. 10 Tagen mit autologen, bestrahlten (8000 rad) PBMC und Antigen restimuliert (die Restimulation erfolgte immer in Medium ohne IL-2). Nach weiteren 5 bis 10 Tagen wurden die T-Zellen kloniert. Dazu wurden sie in RPMI/HuS + 100 U/ml IL-2 in Terazaki-Platten (Nunc, insgesamt 20 µl Medium/Loch) ausgesät (0,3 Zellen/Loch) und mit bestrahlten PBMC (8000 rad; autologe oder heterologe PBMC;  $3 \times 10^4$ /Loch) und 1 µg/ml

Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Wachsende T-Zellen wurden expandiert und im Proliferationstest auf Antigenspezifität getestet. Für die reguläre Zellkultur wurden T-Zellklone in RPMI/FCS + 100 U/ml IL-2 kultiviert und ca. alle 4 bis 8 Wochen mit PHA und bestrahlten PBMC restimuliert.

Bei einigen TT-spezifischen T-Zellklonen wurde das Epitop bestimmt, indem ca.  $5 \times 10^4$  Zellen in 96 Loch-Rundbodenplatten ausgesät und die gereinigten Peptide p2 (TT830-844 QYIKANSKFIGITEL) oder p30 (TT947-967 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) in einer Konzentration von je 1  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben wurden. Aktivierte humane T-Zellen exprimieren MHC II und aggregieren, wenn diese mit Peptid beladen und vom TcR anderer T-Zellen erkannt werden. Die Bildung von Zellklumpen zeigte an, daß das zugegebene Peptid erkannt wurde.

Die MHC-Restriktion einiger T-Zellklone wurde ermittelt, indem sie mit Antigen und unterschiedlichen bestrahlten Feeder-Zellen mit bekanntem HLA (EBV-transformierte B-Zelllinien oder PBMC von Spendern mit bekanntem HLA) stimuliert wurden. Alternativ ließ die Erkennung bestimmter Epitope Rückschlüsse auf die MHC-Restriktion zu (so wird p30 von HLA-DP4 präsentiert).

### 2.11.5 Benutzte CD4<sup>+</sup> T-Zellklone

**SZL TT/42:** spezifisch für TT (Epitop p30), DP4-restringiert

**SZL TT/67:** spezifisch für TT; Restriktion und Epitop unbekannt

**PDE-p2/65:** spezifisch für TT (Epitop p2), DR7-restringiert

**SZL 5.25:** spezifisch für LLO

### 2.11.6 Etablierung von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> (DN) T-Zelllinien und -Klonen

Aus angereicherten Lymphozyten-Präparationen (buffycoats) wurden, wie unter 2.11.3 beschrieben, PBMC isoliert und in adhärenente und nicht-adhärenente Zellen getrennt. Die nicht-adhärenenten Lymphozyten wurden zunächst in FCS + 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und aus den adhärenenten Zellen wurden dendritische Zellen präpariert (2.11.3). Sobald diese ausdifferenziert waren (nach 5-8 Tagen) wurden die Lymphozyten aufgetaut und zunächst die B-Zellen mit Hilfe ihrer Adhärenz an Nylon-Wolle abgetrennt. Dazu wurden 10 ml-Spritzen mit 0,5 g Nylon-Wolle (Type 200L, Robbins Scientific, CA, USA) gefüllt und autoklaviert. Über eine solche Säule konnten  $1 \times 10^8$  Zellen aufgetrennt werden. Die Säulen wurden am Auslauf mit einem 2-Wege-Ventil versehen, mit Waschmedium blasenfrei gefüllt und 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Ca.  $1 \times 10^8$  nicht-adhärenente

PBMC wurden in 2 ml Waschmedium suspendiert und auf die Säule geladen. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurden die nicht-adhärenenten T-Zellen langsam mit Waschmedium von der Säule gespült.

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden durch Kombination von Komplement-Lyse und “negative sorting” mit Hilfe magnetischer beads entfernt. Die Zellen wurden mit den CD4- bzw. CD8-spezifischen Antikörpern 6D10 und OKT8 markiert (eingesetzt als Überstand der entsprechenden B-Zell-Hybridome; 100 µl/10<sup>6</sup> Zellen). Dabei wurden die Zellen durch Zugabe von Waschmedium auf eine Konzentration von 2x10<sup>6</sup>/ml eingestellt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Zellzahl wieder auf 2x10<sup>6</sup>/ml eingestellt und 1 ml Kaninchen-Komplement (Rabbit Complement MA, Cedarlane, Canada) pro 8x10<sup>6</sup> Zellen zugegeben. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C waren CD8<sup>+</sup> T-Zellen fast vollständig und CD4<sup>+</sup> T-Zellen teilweise lysiert (überprüft in Durchflußzytometrie). Die Zellen wurden nach der Komplement-Lyse zweimal gewaschen. Nicht lysierte, Antikörper-markierte Zellen wurden durch nachfolgendes negatives Sorting mit Hilfe magnetischer, Ziege-anti-Maus IgG gekoppelter “Beads” (Dynal) entfernt. Die “Beads” wurden im Verhältnis 5:1 eingesetzt. Vor Gebrauch wurden sie zweimal gewaschen und in 200-500 µl Waschmedium aufgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Sediment mit den suspendierten Beads aufgenommen. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden markierte Zellen mit Hilfe eines Magneten entfernt. Von 1x10<sup>8</sup> T-Zellen blieben nach der Reinigung ca 1x10<sup>5</sup> bis 1x10<sup>6</sup> Zellen übrig, welche zu mehr als 95 % CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> waren (DN T-Zellen).

Zur Etablierung von Zelllinien wurden die gereinigten DN T-Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät (5x10<sup>3</sup> bis 5x10<sup>4</sup>/Loch) und zunächst mit autologen dendritischen Zellen (5x10<sup>4</sup>/Loch) und *L. monocytogenes*-Lysat (1:100; Kap. 2.11.1) stimuliert. Nach Bedarf wurde nach einigen Tagen 5-20 U/ml IL-2 zugesetzt. Ca. alle 2 Wochen wurden die DN T-Zellen mit heterologen, bestrahlten (8000 rad) dendritischen Zellen und Lysat restimuliert, um kontaminierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu eliminieren. Nach 3-4 Restimulationen enthielten die Kulturen 100 % DN T-Zellen, welche in funktionellen Assays eingesetzt werden konnten. Einige Linien wurden wie bereits für CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben kloniert (2.11.4).

### 2.11.7 Herstellung EBV-transformierter B-Zellen

Zur Transformation von B-Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus wurden filtrierte (0,2 µm) Überstände der EBV-produzierenden Zelllinie B95.8 Tx (zur Verfügung gestellt von G. de Libero) benutzt. 2x10<sup>6</sup> PBMC wurden in 1 ml RPMI/FCS aufgenommen, in 24-Loch-Platten ausgesät und mit 1 ml des EBV-haltigen Kulturüberstands versetzt. Nach Inkubation im Brutschrank über Nacht wurden die Zellen

gewaschen und in RPMI/FCS + IL-6 (Kulturüberstand; 1:200) + 5 µg/ml CyclosporinA (Sandimmun, freundlicherweise überlassen von Sandoz) weiterkultiviert. Sobald das Wachstum der transformierten B-Zellen zu erkennen war, wurden diese in RPMI/FCS weiterkultiviert.

Die EBV-B-Zelllinie FEB T2 diente als Kontrolle in Zytotoxizitätstests mit DN T-Zellen. Sie war CD1-negativ. Der TT-spezifische EBV-transformierte B-Zellklon PDE T5-4 wurde isoliert, indem die PBMC anfangs mit 1 µg/ml p2 stimuliert wurden. Die isolierten EBV-B-Zelllinien wurden mit Hilfe des ELISA auf die Produktion TT-spezifischer Antikörper getestet. Positive Linien wurden durch serielle Verdünnung in Rundbodenplatten ohne Feederzellen kloniert. Dieser Klon diente in einigen Experimenten zur Stimulierung des TT-spezifischen (Epitop p30), DP4-restringierten T-Zellklons SZL TT/42.

## 2.12 Zelluläre Tests

### 2.12.1 Proliferationstest

T-Zellen wurden in RPMI/FCS (200 µl/Loch in 96-Loch-Platten) mit bestrahlten (8000 rad) "Feeder"-Zellen (autologe PBMC oder heterologe PBMC bzw. EBV-B-Zellen mit passendem HLA) und Antigen inkubiert. Alle Kulturbedingungen wurden in Triplikaten angesetzt. Die Zahl der Feeder-Zellen variierte in Abhängigkeit vom Zelltyp. DC, Monozyten:  $1 \times 10^4$ /Loch; EBV-transformierte B-Zellen:  $2 \times 10^4$ /Loch; PBMC:  $2 \times 10^5$ /Loch. Die Stärke der T-Zell-Proliferation wurde durch Messung des Einbaus radioaktiv markierten Thymidins gemessen. Dazu wurden 3 bis 5 Tage nach Ansatz des Tests 1 µCi/well  $^3\text{H}$ -Thymidin (TRA310, Amersham, 1:10 verdünnt in RPMI/FCS) zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen auf Glasfasermatten geerntet (Cell Harvester, Immotech) und der Thymidin-Einbau in einem  $\beta$ -Szintillationszähler (Microbeta, Wallac) gemessen.

### 2.12.2 $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätstest

Zur Messung der Antigen-spezifischen Zellyse durch DN T-Zellen wurden die Zielzellen über Nacht mit Antigen (hier Lysat *L. monocytogenes*; 1:100) inkubiert oder als Kontrolle unbeladen eingesetzt. Am nächsten Tag wurden  $1 \times 10^6$  Zielzellen in 100 µl RPMI/FCS plus 100 µCi  $\text{Na-}^{51}\text{CrO}_4$  (Amersham) eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Waschschrte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden auf  $5 \times 10^4$ /ml eingestellt und 100 µl dieser Suspension in 96-Loch-Rundbodenplatten gegeben, in denen unterschiedliche Mengen der Effektorzellen (DN T-Zellen) in 100

µl Medium vorgelegt worden waren. Typischerweise betrug das Verhältnis Effektor-:Zielzellen 2:1 bis 60:1. Als Positiv-Kontrolle (maximale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung) wurden statt Effektorzellen 100 µl PBS + 10 % Triton X-100 vorgelegt, als Negativ-Kontrolle (Hintergrundwert  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung) 100 µl Medium. Alle Bedingungen wurden in Triplikaten angesetzt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur 3 Minuten bei 800 x g anzentrifugiert und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Überstandes entnommen, mit 200 µl Szintillationslösung versetzt und die Zerfälle pro Minute im  $\beta$ -Szintillationszähler (Microbeta, Wallac) gemessen. Die spezifische Zellyse wurde nach folgender Formel errechnet (cpm: counts per minute):

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{cpm - cpm_{\min}}{cpm_{\max} - cpm_{\min}} * 100$$

### 2.12.2.1 JAM-Test

Schnell wachsende Zielzellen konnten statt mit  $^{51}\text{Cr}$  auch mit  $^3\text{H}$ -Thymin markiert werden. In diesem Fall wurde nicht die Freisetzung von Radioaktivität in den Zellüberstand durch direkte Zellyse, sondern die Induktion der DNA-Fragmentierung in den Zielzellen gemessen (252).  $1 \times 10^5$  Zielzellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen und über Nacht oder mindestens 5 Stunden mit 5 µCi  $^3\text{H}$ -Thymin markiert. Die Inkubation der Effektor- und Zielzellen erfolgte wie beim  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätsastest. Als Kontrolle wurden markierte Zielzellen ohne Effektorzellen eingesetzt ( $cpm_{\max}$ ). Nach 4 Stunden wurden die Zellen, wie für den Proliferationsassays beschrieben, auf Glasfasermatten geerntet und der radioaktive Einbau gemessen. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet (cpm: counts per minute):

$$\% \text{ spezifische Zellyse} = \left(1 - \frac{cpm}{cpm_{\max}}\right) * 100$$

### 2.12.3 Inhibitionstest mit gereinigtem LLO

Als Antigen-präsentierende Zellen dienten PBMC, Monozyten, dendritische Zellen oder EBV-transformierte B-Zellen. Evtl. vorhandene Erythrozyten wurden entfernt, indem die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur in 170 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inkubiert und danach gewaschen wurden. Die APC wurden bestrahlt (8000 rad) und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI/FCS eingestellt. LLO wurde, ebenfalls in RPMI/FCS, auf die zweifache gewünschte Endkonzentration vorverdünnt. 500  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden mit 500  $\mu\text{l}$  Zellsuspension gemischt und die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und in Mikrotiterplatten ausgesät ( $1 \times 10^4$  Zellen/Loch), in denen Antigen vorgelegt worden war. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die T-Zellen ( $2 \times 10^4$ /Loch) zugegeben. Die T-Zell-Proliferation wurde gemäß 2.12.1 bestimmt.

### 2.12.4 Messung der TcR-Internalisierung

Zur Messung der TcR-Internalisierung von T-Zellen nach Stimulation mit LLO-behandelten APC wurden Monozyten und dendritische Zellen (2.11.3) wie unter 2.12.3 beschrieben mit LLO behandelt und 4 Stunden mit Antigen inkubiert. Dabei wurden für die spätere Analyse im Durchflußzytometer zehnmal mehr Zellen eingesetzt als im Inhibitionstest. Ein Teil der APC wurde bestrahlt und zur Kontrolle im Inhibitionstest wie unter 2.12.3 beschrieben eingesetzt. Zu den übrigen APC wurden 0,1  $\mu\text{M}$  BCECF-AM (2'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceinacetoxymethylester; Calbiochem) zugegeben. Nach einer Stunde wurden die APC gewaschen, mit den T-Zellen gemischt (pro Bedingung  $1 \times 10^5$  APC und  $2 \times 10^5$  T-Zellen) und weitere zwei Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit anti-CD3 (PE-gekoppelt) gefärbt. Im Durchflußzytometer konnten die APC anhand der BCECF-Färbung und ihrer Lage im "forward scatter" von den T-Zellen unterschieden werden. Die Internalisierung der T-Zell-Rezeptoren konnte als Verschiebung der CD3-Färbung verfolgt werden. Der geometrische Mittelwert der CD3-Färbung diente zur Berechnung der TcR-Internalisierung nach der folgenden Formel (x = gemessener geometrischer Mittelwert; min = geometrischer Mittelwert ungefärbter T-Zellen; max = geometrischer Mittelwert ohne Antigen und APC):

$$\% \text{ TcR-Internalisierung} = \left(1 - \frac{x - \text{min}}{\text{max} - \text{min}}\right) * 100$$

### 2.12.5 “Limiting Dilution Analysis”

Die Frequenz spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut, welche durch gereinigte Antigene von *L. monocytogenes* stimuliert wurden, wurde mit Hilfe der “Limiting Dilution Analysis” bestimmt. Dazu wurden PBMC isoliert. Ein Teil der Zellen wurde bestrahlt (8000 rad) und als “Feeder”-Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten vorgelegt ( $3 \times 10^4$ /Loch). Unbestrahlte PBMC wurden als Effektorzellen in verschiedenen Mengen (500 bis 10000 Zellen/Loch; 24 Replikate pro Bedingung) zugegeben und in Gegenwart von 1 µg/ml gereinigter Proteine aus *L. monocytogenes* kultiviert. Nach 5 Tagen wurden 5 U/ml IL-2 und nach 6 Tagen 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin/Loch zugegeben. Die Zellen wurden an Tag 7 geerntet und der Einbau radioaktiv markierten Thymidins im β-Szintillationszähler gemessen. Als Hintergrund-Proliferation diente der Mittelwert aus Kulturen ohne Effektorzellen plus 3 x Standardabweichung. Alle Kulturen, deren Proliferation oberhalb dieser Schwelle lag, wurden als positiv gewertet. Daraufhin wurde für jede Bedingung (Anzahl der Effektorzellen) der Quotient der negativen Kulturen, bezogen auf die Gesamtzahl der Kulturen ermittelt. Die Quotienten wurden logarithmisch gegen die Zahl der eingesetzten Effektorzellen aufgetragen und die lineare Regression mit Hilfe eines Computerprogramms errechnet (Sigmaplot, Jandel Scientific Software). Nach der Poisson-Verteilung konnte bei einem Quotienten von 0,37 der reziproke Wert der Häufigkeit spezifisch proliferierender Zellen direkt abgelesen werden (253).



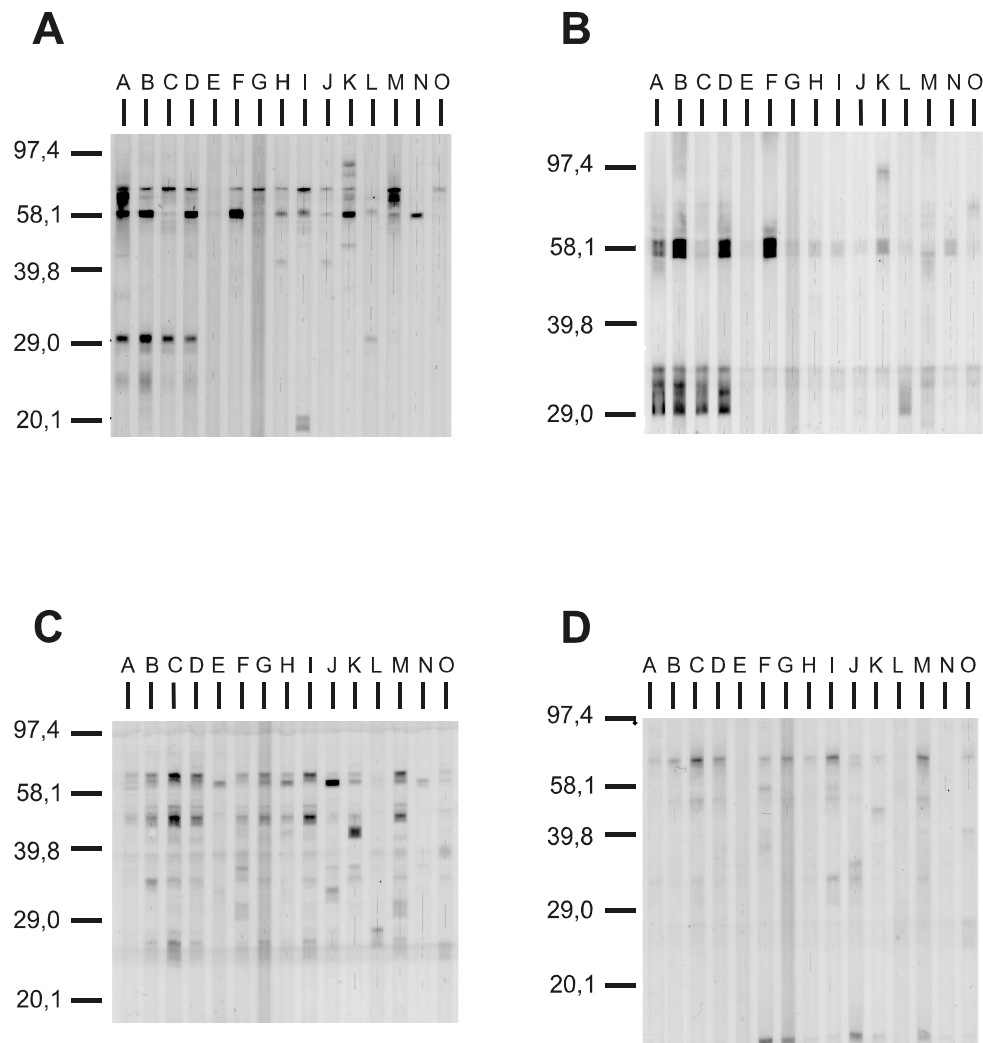
## 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden drei Teilbereiche der Interaktion von *Listeria monocytogenes* mit dem humanen Immunsystem bearbeitet. Im ersten Teil wurde die Antikörperantwort gegen Proteine von *L. monocytogenes* in gesunden Kontaktpersonen sowie in Listeriose-Patienten charakterisiert. Der zweite Teil behandelte die Störung der Antigen-Prozessierung durch Listerien. Im letzten Teil wurde untersucht, ob DN T-Zellen mit Spezifität für listerielle Komponenten induziert werden konnten.

### 3.1 Die spezifische humorale Immunantwort gegen Proteinantigene von *Listeria monocytogenes*

Um festzustellen, ob gesunde Spender, bei denen ein früherer Kontakt mit Listerien bekannt oder wahrscheinlich war (vgl. Kap. 2.2), eine Antikörper-Antwort gegen *L. monocytogenes* entwickelt hatten, wurden zunächst sowohl Zellwand- als auch sekretierte Proteine aus *L. monocytogenes* EGD pERL50-1 *prfA* 7973 und *L. innocua* präpariert und als Antigen in Immunoblots eingesetzt. Der benutzte *L. monocytogenes*-Stamm exprimiert verstärkt *prfA*-kontrollierte Virulenzfaktoren. Dadurch sollte der Nachweis solcher Antikörper erleichtert werden, welche Virulenz-Faktoren und damit *L. monocytogenes*-spezifische Antigene erkannten. Die zu testenden Seren konnten so außerdem relativ stark verdünnt in Immunoblots eingesetzt werden, wodurch auch Kreuzreaktionen minimiert wurden. Die Proteinextrakte wurden mit Seren gesunder Spender inkubiert (Abb. 9). Für Spender E, G und K war kein Kontakt mit Listerien bekannt. Sie dienten als Kontrollen.

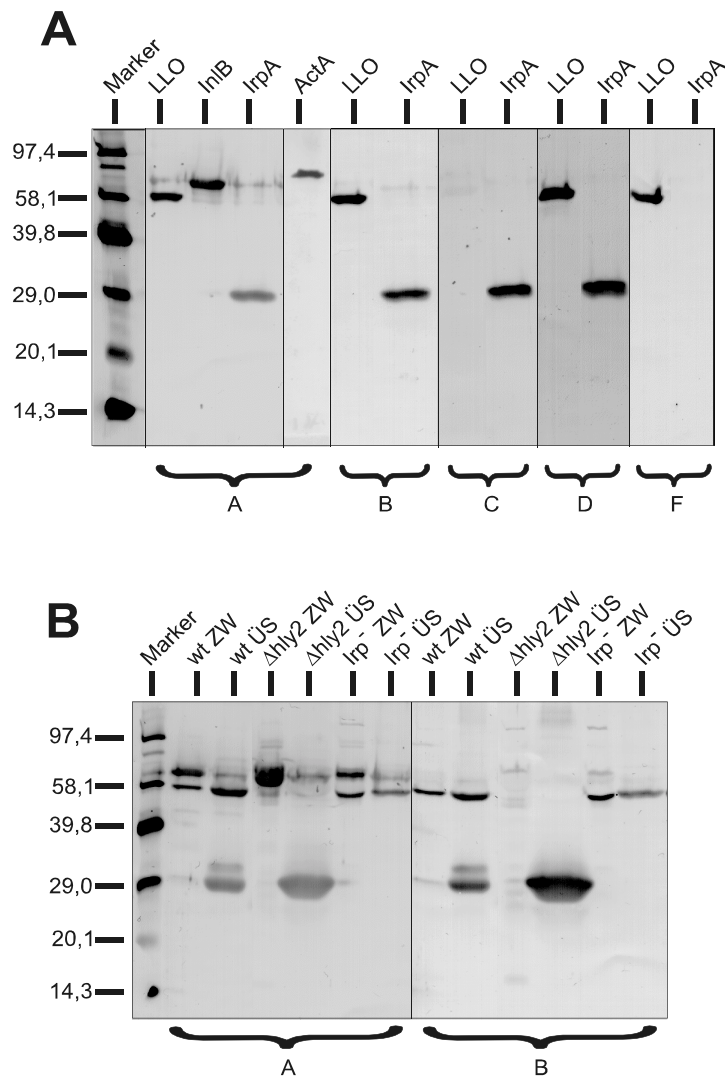
Sowohl im Zellwand-Extrakt als auch im konzentrierten Überstand von *L. monocytogenes* wurden bei einigen Spendern hauptsächlich zwei Banden mit einer Masse von 58 bzw. 30 kDa angefärbt (Abb. 9 A,B). Im Zellwandextrakt wurde darüberhinaus eine Bande mit einer Masse von ca. 80 kDa angefärbt. Diese erschien jedoch auch bei Immunoblots, bei denen Zellwandextrakte von *L. innocua* als Antigen eingesetzt worden waren (Abb. 9 C). Während mit den Seren einiger Spender (A,B,D) beide Banden angefärbt wurden, erkannten Seren anderer Spender (C, F) nur eine der Banden. Nur fünf (A-D, F) der 13 Spender, bei denen ein Kontakt mit Listerien vermutet worden war, besaßen IgG-Antikörper, die spezifisch mit sekretierten Proteinen von *L. monocytogenes* reagierten. In 20 zufällig ausgesuchten Seren, die von Blutspendern stammten, wurden keine spezifischen Antikörper gegen Protein-Extrakte aus *L. monocytogenes* gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Banden von 58 und 30 kDa wurden nicht detektiert in Proteinextrakten von *L. innocua*. Die Antikörperreaktion war hier allgemein schwächer und sehr viel heterogener (Abb. 9 C,D). Spender K und N besaßen Antikörper gegen ein ca. 58 kDa schweres Zellwandprotein aus *L. monocytogenes*, das jedoch im Extrakt sekretierter Proteine nicht angefärbt wurde.



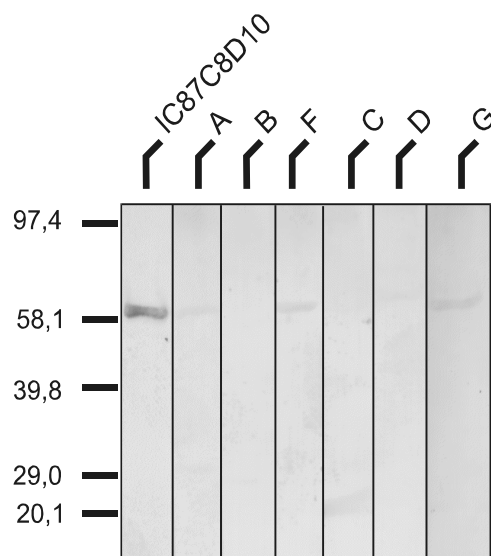
**Abb. 9.** Anfärbung zweier Proteine aus *L. monocytogenes* im Immunoblot mit Seren gesunder Spender. Zellwandextrakt (A,C) oder Überstandproteine (B,D) von *L. monocytogenes* (A,B,) oder *L. innocua* (C,D) wurden als Antigen im Immunoblot eingesetzt und mit Hilfe einer Streifenblotkammer mit Seren gesunder Spender angefärbt. Bei allen gezeigten Spendern außer E, G, und K war ein früherer Kontakt mit Listerien, jedoch keine Listeriose-Erkrankung, bekannt. Als Sekundärantikörper diente Ziege-anti-human IgG (h). Ziffern entsprechen einem Molekulargewichtsstandard (Angaben in kDa).

Die Größe der Banden von 58 bzw. 30 kDa ließ darauf schließen, daß es sich bei den detektierten Proteinen um Listeriolysin (244) bzw. IrpA (Internalin related proteinA) (153) handeln könnte. Daher wurden in Immunoblots gereinigtes Listeriolysin und IrpA (2.4) als Antigen eingesetzt und mit Seren positiver Spender behandelt (Abb. 10A). Wiederum wurden mit einigen der Seren nur LLO oder IrpA angefärbt, während andere beide Antigene erkannten. Um die Identität der beiden hauptsächlich erkannten Banden endgültig zu klären, wurden Zellwand- und sekretierte Proteine von Mutanten als Antigene eingesetzt, die kein LLO bzw. IrpA produzierten (Abb. 10B). Wie erwartet, erschien keine 58 kDa-Bande bei Proteinextrakten von *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2, während bei Extrakten von *L.*

*monocytogenes* irpA<sup>-</sup> die 30 kDa-Bande fehlte. Dies galt für alle seropositiven Spender (in Abb. 10B sind nur Spender A und B gezeigt). Im Serum von Spender A fanden sich zusätzlich Antikörper, welche gereinigtes InlB und ActA erkannten (Abb. 10A), während keines der übrigen Seren diese Proteine im Immunoblot anfärbte (nicht gezeigt). Mit diesem Serum wurde InlB auch im Zellwandextrakt angefärbt (Abb. 10B, mit ZW bezeichnete Spuren).



**Abb. 10.** Identifizierung von LLO und IrpA als wichtigste Antigene der humanen humoralen Immunantwort. Nachweis von spezifischem IgG. (A) Gereinigtes LLO und IrpA wurden als Antigen in Immunoblots eingesetzt und mit Seren verschiedener gesunder Spender angefärbt. Das Serum von Spender A enthielt außerdem spezifische Antikörper gegen InlB und ActA. (B) Zellwandextrakte (ZW) und Überstandspoteine (ÜS) von *L. monocytogenes* EGD pERL50-1 *prfA* 7973 (wt),  $\Delta hly2$  *prfA* 7973 ( $\Delta hly2$ ) und *irpA2* (*irp*<sup>-</sup>) wurden als Antigene in Immunoblots eingesetzt und mit Seren der Spender A und B angefärbt. Die senkrechten Striche zeigen an, wo die Abbildungen aus verschiedenen Immunoblots zusammengesetzt wurden.



**Abb. 11.** p60 gehört nicht zu den Hauptantigenen der spezifischen humoralen Immunantwort. Gereinigtes p60 wurde als Antigen in Immunoblots eingesetzt und mit Seren positiver Spender inkubiert. Als Positiv-Kontrolle diente der monoklonale Antikörper IC87C8D10.

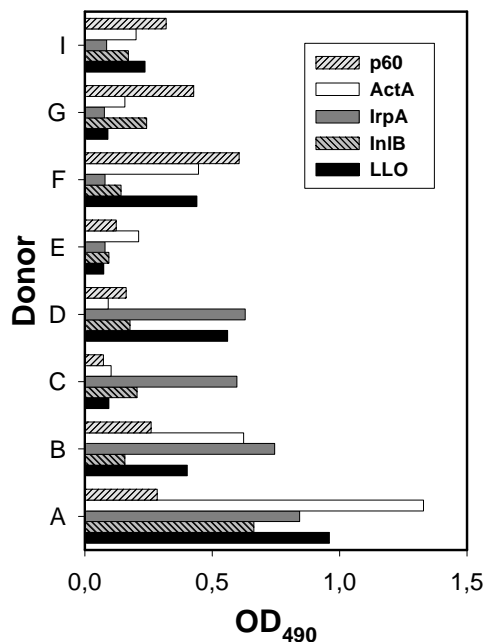
Die bisherigen Ergebnisse deuteten auf LLO und IrpA als die wichtigsten Antigene der spezifischen humoralen Immunantwort im Menschen hin. Allerdings wurde von anderen beschrieben, daß die Murein-Hydrolase p60 im Menschen eine stärkere Antikörperantwort induziert als LLO (229). p60 (Molekulargewicht von ca. 60 kDa) könnte im Immunoblot leicht mit LLO (MW 58 kDa) verwechselt werden. Es erschien jedoch keine solche Bande, wenn Extrakte aus *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2, die kein LLO mehr produzieren, verwendet wurden (Abb. 10B). Um auszuschließen, daß dieses Ergebnis auf eine zu geringe Konzentration von p60 in den Protein-Extrakten zurückzuführen sei, wurde p60 gereinigt und als Antigen in Immunoblots eingesetzt. Die Konstruktion eines Hyperexpressionsstammes sowie die Reinigung und teilweise Charakterisierung von p60 sind weiter

unten in dieser Arbeit beschrieben (Kap. 3.3). Keines der getesteten Seren zeigte eine nennenswerte Reaktion (nur mit Seren der Donoren A und F war eine schwache Färbung erkennbar), während p60 mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper IC87C8D10 detektiert werden konnte (Abb. 11).

### 3.1.1 Quantifizierung der spezifischen humoralen Immunantwort

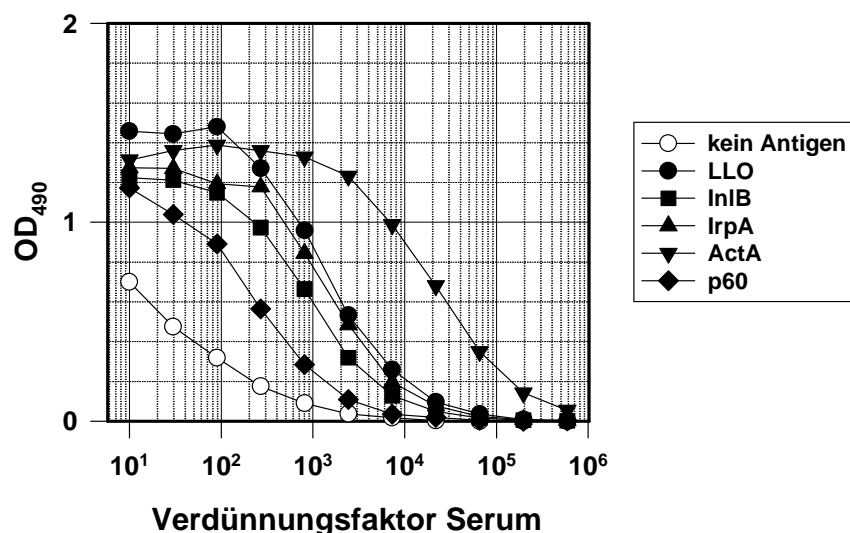
Mit Hilfe von Immunoblots waren die Proteine identifiziert worden, welche als Antigene für die spezifische humorale Immunantwort gegen *L. monocytogenes* in gesunden Spendern dienen können. Diese Methode erlaubte allerdings nur eine grobe Abschätzung der Stärke der Antikörper-Produktion gegen einzelne Proteine. Die Quantifizierung der Antikörper-Antwort erfolgte daher im ELISA. Damit wurde gleichzeitig überprüft, ob die Ergebnisse der Immunoblots bestätigt werden konnten, wenn das Antigen in nativer Form vorlag.

Zu Überprüfung der Ergebnisse der Immunoblots wurden gereinigte Listerien-Proteine (LLO, IrpA, InlB, ActA und p60) als Antigen im Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) eingesetzt und zunächst mit Seren gesunder Spender (Verdünnung 1:800) inkubiert (Abb. 12). Während die mit LLO, IrpA und InlB erhaltenen Ergebnisse mit denen der Immunoblots vergleichbar waren, reagierten mit ActA und p60 im ELISA teilweise auch Seren, die im Immunoblot keine Färbung dieser Antigene gezeigt hatten (Donoren B und F, Abb. 12).



**Abb. 12.** Analyse der IgG-Antwort gegen gereinigte listerielle Antigene im ELISA. Seren wurden in einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt, der unspezifische Hintergrund betrug 0,1 (nicht subtrahiert).

Zur Quantifizierung der spezifischen humoralen Immunantwort gegen *L. monocytogenes* wurden die eingesetzten Seren austitriert und der Sekundärantikörper sowie die Peroxidase in einer Verdünnung eingesetzt, in der sie die Farbreaktion limitierten. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine sigmoide Färbungskurve (Abb. 13 zeigt als Beispiel Donor A). Mit ihrer Hilfe wurde der spezifische IgG-Titer aus der reziproken Serum-Verdünnung, die eine halbmaximale Farbreaktion ergab, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt und den Ergebnissen der Immunoblots gegenübergestellt. Wiederum korrespondierten die Ergebnisse des quantitativen ELISA für LLO, IrpA und InlB mit denen der Immunoblots. Die Titer LLO- und IrpA-spezifischer Antikörper waren generell etwas höher verglichen mit anderen, wobei Donor A einen extrem hohen Titer ActA-spezifischer Antikörper



**Abb. 13.** Ermittlung des spezifischen IgG-Titers. Beispiel Donor A. Gereinigte Antigene (0,5 µg/ml) wurden im ELISA mit seriell verdünnten Seren inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:20.000, Streptavidin-gekoppelte Peroxidase 1:100.000 eingesetzt. Der Titer wurde aus der reziproken Verdünnung, die eine halbmaximale Farbreaktion ergab, ermittelt.

aufwies, während die Anfärbung dieses Antigens im Immunoblot eher schwächer ausfiel. Die Titer p60-spezifischer Antikörper waren relativ niedrig, außer bei Donor F (das Serum dieses Donors ergab auch ein schwaches Signal im Immunoblot mit gereinigtem p60; vgl. Abb. 11). Die Donoren E und G, für die kein früherer Kontakt mit Listerien bekannt war, zeigten weder im ELISA noch im Immunoblot eine nennenswerte Reaktion gegen listerielle Proteine.

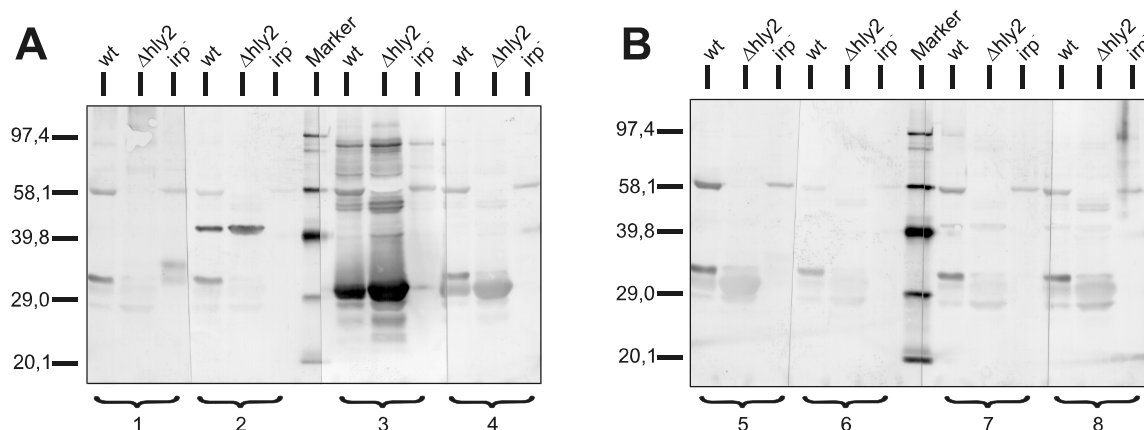
**Tab 1.** Spezifische IgG Titer im Serum im Vergleich zu den Ergebnissen der Immunoblots

Donor	IgG Titer <sup>a)</sup>					Reaktion im Immunoblot <sup>b)</sup>				
	LLO	IrpA	InlB	ActA	p60	LLO	IrpA	InlB	ActA	p60
gesunder Spender										
A	1500	2000	1000	20000	200	++	++	++	+	-
B	400	1000	-	900	300	+	++	-	-	-
C	-	500	-	-	-	-	++	-	-	-
D	400	800	-	-	300	+	++	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	700	-	-	400	800	+	-	-	-	+/-
G	-	-	200	100	400	-	-	-	-	+/-
I	200	-	-	100	300	-	-	-	-	-
Listeriose Patient										
1	300	100	300	4000	400					
2	-	-	200	100	-					
3	3000	10000	8000	5000	1000					
4	200	500	400	500	300					
5	500	100	-	500	500					
6	-	-	400	-	-					
7	100	-	100	400	100					
8	100	500	500	400	500					

a) IgG Titer wurden im ELISA bestimmt. Seren wurden seriell verdünnt und der Titer aus der reziproken Verdünnung, die eine halbmaximale Farbreaktion ergab, bestimmt. (-) kein IgG-Titer detektierbar. b) Die Reaktion im Immunoblot wurde visuell bestimmt. (+) positive Reaktion, (++) sehr starke Reaktion, (+/-) schwache Reaktion, (-) keine Reaktion. Als Antigene für ELISA und Immunoblot dienten gereinigte Proteine. Bei Listeriose-Patienten wurden nur die IgG-Titer mit Hilfe des ELISA bestimmt.

### 3.1.2 Analyse der Antikörperantwort in Listeriose-Patienten

Die Antikörperantwort gesunder Individuen könnte sich von der in Listeriose-Patienten unterscheiden, da Listeriose bei Erwachsenen nur in Personen mit geschwächtem Immunsystem auftritt. Daher wurden Überstandproteine von *L. monocytogenes* und verschiedener Mutanten im Immunoblot mit Seren von Patienten angefärbt. Das Muster der erkannten Proteine glich dem Muster, das mit Seren gesunder Spender gefunden worden war (Abb. 14). Sieben von acht Patienten-Seren erkannten LLO, während vier Seren (Nr. 3, 4, 5 und 8) die 30 kDa-Bande von IrpA anfärbten. Interessanterweise färbten die übrigen Seren eine 32 kDa-Bande von *L. monocytogenes* sogar stärker an. Diese Bande fehlte in der IrpA2<sup>-</sup>-Mutante. Monoklonale Antikörper, die spezifisch IrpA erkannten, kreuzreagierten ebenfalls mit diesem Protein (Daten nicht gezeigt). Es wäre daher möglich, daß es sich bei diesem Protein um eine unprozessierte oder modifizierte Form von IrpA handelt. Wie schon die Seren gesunder Spender färbten auch die Seren der Listeriose-Patienten p60 im Immunoblot nicht an, da eine entsprechende Bande im Überstand von *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2 fehlte.



**Abb. 14.** Die Antikörperantwort in Listeriose-Patienten gleicht der gesunder Spender. Konzentrierte Überstände von *L. monocytogenes* EGD pERL50-1 *prfA* 7973,  $\Delta$ hly2 + *prfA* 7973 oder *irpA*2<sup>-</sup> wurden als Antigen im Immunoblot eingesetzt und mit Seren von Listeriose-Patienten (1-8) angefärbt.

Mit dem Serum von Patient 2 wurde ein unbekanntes Protein mit einer Masse von 40 kDa detektiert, das im Überstand von *L. monocytogenes* IrpA2<sup>-</sup> fehlte. Beim Versuch, dieses Protein näher zu charakterisieren, zeigte sich, daß es auch im Überstand von *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und, interessanterweise, *L. monocytogenes*  $\Delta$ irpA2<sup>-</sup> detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen dieser Bande in der Insertionsmutante (IrpA2<sup>-</sup>) könnte auf Transposon-Insertion an einem Genort zurückzuführen sein, der von *irpA* verschieden ist. Da diese Bande auch in nicht-pathogenen Spezies erschien, wurde von einer genaueren Charakterisierung abgesehen.

Die quantitative Analyse der Antikörper-Antwort bestätigte größtenteils die im Immunoblot erhaltenen Ergebnisse. Generell wurde in Listeriose-Patienten ein breiteres Spektrum von Listerien-Antigenen erkannt als in gesunden Spendern (Tab. 1). Fünf Patienten besaßen nennswerte ( $>200$ ) IgG-Titer gegen InlB und sechs gegen ActA, während von den Seren gesunder Spender nur eines Antikörper mit Spezifität für InlB besaß und drei Seren im ELISA mit ActA reagierten. Drei Patienten (Nr. 2, 6 und 7) besaßen nur niedrige IgG-Titer gegen die im ELISA getesteten Proteine. Allerdings erkannten diese drei Seren im Immunoblot nur die vermutete 32 kDa-Isoform von IrpA (Abb. 14) und zwei von ihnen reagierten im Immunoblot mit LLO. Darüberhinaus zeigten nur zwei der Patienten-Seren im ELISA signifikante IgG-Titer gegen LLO, während im Immunoblot alle Patienten-Seren außer Nr. 6 eindeutig mit LLO reagierten. Hierfür könnte der relativ hohe Lipid-Gehalt in den Patienten-Seren verantwortlich sein, wodurch die Bindung von Antikörpern an LLO unter nativen Bedingungen, wie im ELISA, inhhiert werden könnte (244). Obwohl keines der Patienten-Seren im Immunoblot p60 im gefällten Überstand anfärbte, besaßen fünf Seren den Ergebnissen des ELISA zufolge einen signifikanten IgG-Titer gegen dieses Protein.

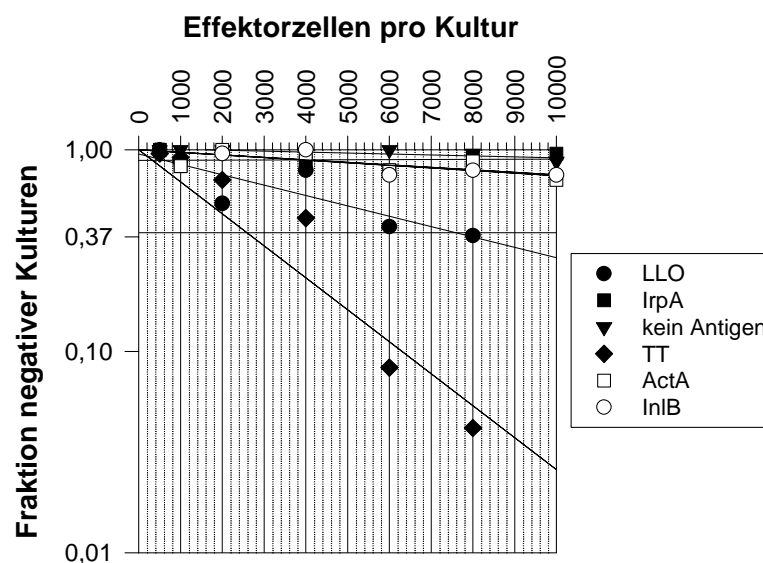
### 3.2 Frequenz *L. monocytogenes*-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut gesunder Spender

Für die Einleitung der spezifischen humoralen Immunantwort wird die Hilfe spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigt. Um zu ermitteln, ob die Produktion spezifischer Antikörper im Blut gesunder Donoren sich auch in der Zahl *L. monocytogenes*-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut widerspiegelte, wurde deren Frequenz mit Hilfe der "Limiting Dilution Analysis" (Kap. 2.12.5) bestimmt. Dazu wurden PBMC einiger Donoren in unterschiedlichen Zellzahlen als Effektorzellen eingesetzt, mit verschiedenen gereinigten Proteinen aus *L. monocytogenes* bzw. Tetanus-Toxoid als Vergleich stimuliert und die Proliferation durch Einbau radioaktiv markierten Thymidins gemessen. Eine Aufreinigung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen war dabei nicht nötig, da unter den gewählten Bedingungen nur diese Zellen proliferieren sollten. Jede Bedingung (Zahl der Effektorzellen) wurde in 24 Replikaten angesetzt. Kulturen, deren Proliferation deutlich über der Hintergrundkontrolle ohne Effektorzellen lag, wurden als positiv bewertet.

Bei geeigneter Wahl der Effektorzellzahl konnte die Frequenz Antigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Verhältnis der negativen zu positiven Kulturen ermittelt werden (Kap. 2.12.5). Tetanus-Toxoid wurde als Kontrolle gewählt, da aufgrund der allgemein üblichen Tetanus-Impfungen jeder Spender eine relativ hohe Frequenz TT-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen sollte. Abb. 15 zeigt als Beispiel Donor F. Die erhaltenen Werte spiegelten die Frequenz spezifischer T-Zellen bezogen auf die gesamten



peripheren Leukozyten (außer Granulozyten, welche bei der Isolierung von PBMC abgetrennt wurden) wider. Tab. 2 zeigt die Frequenzen spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen einiger Donoren. Donor A, in dessen Serum die höchsten Antikörper-Titer gegen ein breites Spektrum von Listerien-Proteinen gefunden worden war, besaß eine hohe Frequenz LLO- und IrpA- spezifischer sowie eine geringere Frequenz InlB-spezifischer T-Zellen. Diese waren in den übrigen Donoren deutlich niedriger bzw. nicht detektierbar. Nur im Blut von Donor B fand sich eine vergleichbare Frequenz LLO-spezifischer T-Zellen. Auffälligerweise korrelierten die Frequenzen spezifischer T-Zellen bei den Donoren B und C nicht mit den gefundenen Antikörper-Titern. Donor B besaß neben Antikörpern gegen LLO auch einen hohen IgG-Titer gegen IrpA, jedoch fanden sich keine IrpA-spezifischen T-Zellen. Ebenso konnten in Donor C keine T-Zellen detektiert werden, die für eines der getesteten Antigene spezifisch waren, obwohl dieser Spender einen recht hohen IrpA-spezifischen IgG-Titer besaß.



**Abb. 15.** Bestimmung der Frequenz spezifischer T-Zellen im Blut. Beispiel Donor F. Die Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch mit gereinigten Proteinen aus *L. monocytogenes* proliferierten, wurde mit Hilfe der "Limiting Dilution Analysis" bestimmt (Kap. 2.12.5). Als Vergleichsantigen diente Tetanus-Toxoid (TT). Zur internen Kontrolle wurde außerdem PHA eingesetzt. Mit PHA waren alle Kulturen positiv (Quotient negativ/positiv = 0), weshalb diese Werte nicht im Graphen erscheinen.

Alle Donoren besaßen ähnliche Frequenzen TT-spezifischer T-Zellen. Dieses Antigen war als Kontrolle eingesetzt worden. Als zusätzliche interne Kontrolle des “Limiting Dilution” Tests wurde auch PHA, welches alle T-Zellen stimuliert, als Antigen eingesetzt. Mit PHA waren unter den gewählten Bedingungen (> 500 Effektorzellen) alle Kulturen positiv (nicht gezeigt). Da keine Listeriose-Patienten als Blutspender zur Verfügung standen, konnten die mit gesunden Spendern erhaltenen Daten nicht mit denen von Patienten verglichen werden.

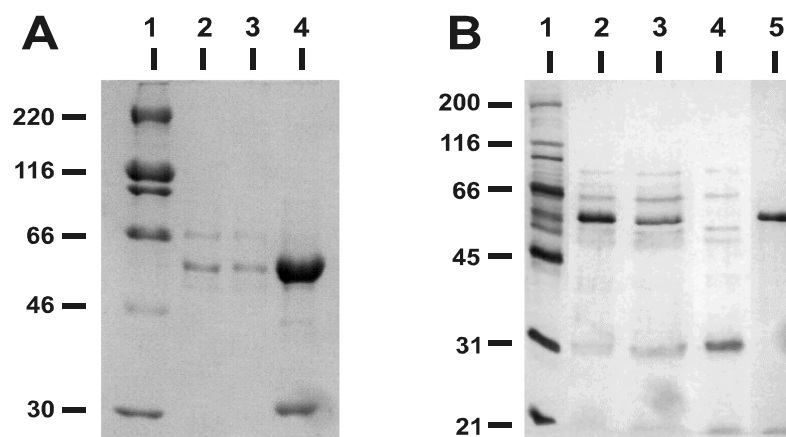
**Tab. 2.** Frequenzen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifität für Proteine aus *L. monocytogenes* von einigen gesunden Donoren. ND: nicht detektierbar; NA: nicht analysiert.

Donor	Antigen					
	LLO	IrpA	InlB	ActA	TT	-
A	1:1600	1:1800	1:9000	ND	1:1600	ND
B	1:2600	ND	NA	NA	1:1400	ND
C	ND	ND	ND	ND	1:1800	ND
F	1:8000	ND	ND	ND	1:2800	ND

### 3.3 Reinigung und Charakterisierung von p60

Für einige Versuche zur Untersuchung der spezifischen humoralen Immunantwort gegen *L. monocytogenes* (3.1) sowie für Experimente zur Vakzin-Entwicklung gegen Listerien ((254), nicht in dieser Arbeit beschrieben) war die Reinigung von p60 in großem Maßstab erforderlich. Im Gegensatz zu den übrigen Virulenz-Faktoren ist die Murein-Hydrolase p60 ein essentielles Protein, und Deletions-Mutanten sind nicht überlebensfähig (159). Es existieren lediglich *L. monocytogenes*-Mutanten mit einer verringerten Produktion von p60. Diese sind in ihrer Zellteilung gestört und bilden Ketten aneinanderhängender einzelner Bakterien (158). Außerdem exprimieren alle Listerien-Spezies homologe Proteine (160). Daher konnte der apathogene Stamm *L. innocua* nicht zur Produktion von p60 genutzt werden, wie z.B. bei der Überexpression und Reinigung von LLO (244). Die Konstruktion eines p60-produzierenden *E. coli*-Stammes hingegen hätte das Hinzufügen spezieller Sekretionssignale erfordert. Daher wurden zur Konstruktion eines Hyperexpressionsstammes zunächst *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2 und später *L. monocytogenes*  $\Delta$ VGC benutzt. Bei letzterem ist der gesamte Virulenz-Gencluster deletiert, so daß dieser Stamm wie ein apathogenes Bakterium behandelt werden kann. Für die Reinigung von p60 aus beiden Stämmen wurde dasselbe Protokoll benutzt (Kap. 2.10.2). Die nachfolgend gezeigten Daten zur Reinigung dieses Proteins beziehen sich ausschließlich auf *L. monocytogenes*  $\Delta$ VGC pEP2-p60.

Der Hyperexpressionsvektors pEP2-p60 (Kap. 2.10.1) enthält das Gen für p60 unter der Kontrolle des ActA-Promoters, der vom prfA-Genprodukt, das auf demselben Plasmid kodiert ist, positiv reguliert wird. Zusammen mit der hohen Kopienzahl des Plasmids bewirkt dies die Hyperexpression von p60. Die Analyse des Kulturüberstands des Hyperexpressionsstammes *L. monocytogenes*  $\Delta$ VGC pEP2-p60 in der SDS-PAGE zeigte, daß dieser Stamm tatsächlich große Mengen eines Proteins mit einem Gewicht von ca. 60 kDa produzierte (Abb. 16A).



**Abb. 16.** Hyperexpression und Reinigung von p60. A: Vergleich der Kulturüberstände von *L. m.* EGD (Spur 2), *L. m.*  $\Delta$ VGC (Spur 3) und *L. m.*  $\Delta$ VGC pEP2-p60. 1 ml Kulturüberstand wurde mit 10 % TCA gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde nach Coomassie angefärbt. B: Kontrolle der einzelnen Reinigungsschritte. Je 5  $\mu$ l Probe wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Silberfärbung (2.8) entwickelt. Spur 2: Konzentrierter Kulturüberstand, Spur 3: Auftrag Gelfiltration, Spur 4: Waschen der MonoS-Säule bei pH8,35, Spur5: Elution von p60 mit 1M NaCl. Spur1: Molekulargewichtsstandard

Die Reinigung von p60 aus Kulturüberständen der beiden Hyperexpressionsstämme wurde in zwei Schritten durchgeführt (2.10.2). Im ersten Schritt wurden niedermolekulare Komponenten des Mediums sowie listerielle Proteine mit einem Molekulargewicht  $< 30$  kDa durch Gelfiltration abgetrennt. Danach wurde p60 durch Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Die Bindung an das Säulenmaterial erfolgte bei pH 4, gefolgt von einem Waschschriff bei pH 8,35. Dabei wurde der extrem hohe pI-Wert (pI 11) des Proteins ausgenutzt. Unter diesen Bedingungen blieb nur p60 am Säulenmaterial gebunden (Abb. 16B, Spur 4). Die Elution erfolgte unter Hochsalzbedingungen (Abb. 16B, Spur 5). Ein Salzgradient wurde nicht benötigt. Zur Kontrolle wurden Proben der verschiedenen Reinigungsschritte in der SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 16B). Durch Ansequenzieren des Aminoterminus wurde bestätigt, daß es sich bei dem gereinigten Protein um p60 - nach Abspaltung des für die Sekretion erforderlichen Signalpeptids - handelte (Kap. 2.10.3 und Abb. 17).

<i>L.monocytogenes</i> p60:	28	STVVVEAGDTLWGIAQSKGTTVDAIKKAN	56
consensus:		STVVVEAG LW IA SKG VD IKKAN	
gereinigtes Protein:	1	STVVVEAGXXLWXIAXSKGXXVDXIKKAN	29

**Abb. 17.** Vergleich der N-terminalen Sequenz des gereinigten Proteins mit p60 aus *L. monocytogenes* (GenPept Zugriffsnummer CAA36509). Die Konsensus-Sequenz beginnt ab Aminosäure 28, der ersten Aminosäure des reifen Proteins nach Abspaltung der Signalsequenz. Mit X bezeichnete Aminosäuren konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3.3.1 Bestimmung der Ausbeute

Um die Ausbeute während der verschiedenen Reinigungsschritte abschätzen zu können, wurde ein spezifischer Sandwich-ELISA entwickelt. Zunächst wurden mit dem gereinigten p60 Kaninchen oder Mäuse immunisiert, um polyklonale bzw. monoklonale spezifische Antikörper herstellen zu können. Die Spezifität der erhaltenen Antikörper wurde im Immunoblot mit gereinigtem p60 als Antigen überprüft (Daten nicht gezeigt). Im Sandwich-ELISA wurde der monoklonale Antikörper Fu p60.21.14 als Fang- und polyklonales Kaninchen-anti-p60-Serum als Nachweisantikörper benutzt. Als Standard wurde gereinigtes p60 eingesetzt, dessen Konzentration mit Hilfe eines modifizierten Bradford-Tests bestimmt worden war (Kap. 2.7). Die Gesamt-Ausbeute an gereinigtem p60, bezogen auf die Gesamtmenge im Kulturüberstand, betrug ca. 45 %. Die größten Verluste traten bei der Konzentrierung des Überstandes und bei der Gelfiltration auf (Tab. 3).

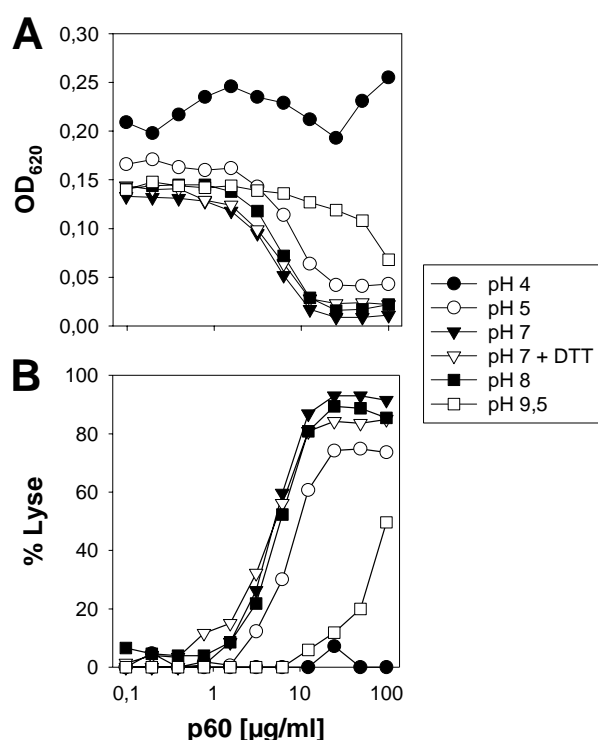
**Tab. 3:** Ausbeute bei der p60-Reinigung. Die Werte beziehen sich auf einen Durchlauf der Reinigung (ausgehend von 20 ml konzentriertem Überstand). Werte in Klammern geben die Werte bezogen auf das Gesamtvolumen der Ausgangskultur (4,5 l) an.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Konzentration p60 [µg/ml]	Gesamtmenge p60 [mg]	Anreicherung	Ausbeute [%]
Überstand	1125 (4500)	6	6.75 (27)	-	100
konz. Überstand	20 (80)	240	4.8 (19.2)	40 x	71
Filtrat	1105 (4420)	1,8	2 (8)	-	-
Gelfiltration - gesammelte Fraktionen	110	29	3.19	-	47.3
Durchlauf MonoS		N.D.	-	-	-
Waschen MonoS	10	8	0.08	-	-
Eluat MonoS (Fraktion 1)	2	340	3.08*	57 x	45.6*
Eluat MonoS (Fraktion 2)	2	1200		200 x	

\*: Werte berechnet für Gesamtmenge Eluat (Fraktion 1+2)

### 3.3.2 Enzymatische Aktivität des gereinigten p60

Die Murein-Hydrolase p60 wird von *L. monocytogenes* zur Zellteilung benötigt, spielt jedoch auch eine Rolle bei der Infektion bestimmter Wirtszellen (156, 157). Da das gereinigte p60 im Zuge einer Zusammenarbeit mit Kollaborationspartnern auch dazu verwendet werden sollte, eine eventuelle Funktion bei der Überwindung der Darmwand durch *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurde seine enzymatische Aktivität geprüft.



**Abb. 18.** Lytische Aktivität von p60. Lyophilisierte Zellen von *Micrococcus lysodeikticus* wurden mit p60 (in diesem Fall aus *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2 pEP2-p60) in verschiedenen Verdünnungen inkubiert und die Zellyse photometrisch bestimmt. A: Bestimmung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der p60-Konzentration. B: Die Werte der optischen Dichte wurden in % Lyse umgerechnet (9).

tes p60 nach einer früher veröffentlichten Methode (159) in einem Polyacrylamid-Gel mit eingegossenen *M. lysodeikticus*-Zellen aufgetrennt. Das Gel wurde in 10 mM Tris, 1 mM DTT (pH 7,6) umgepuffert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es zeigte sich ausschließlich ein Lysehof an der Position des p60-Proteins (Daten nicht gezeigt). Damit war gezeigt, daß die gemessene lytische Aktivität tatsächlich vom gereinigten p60-Protein stammte.

Dazu wurde eine 0,02 %ige Zellsuspension von *Micrococcus lysodeikticus* in ELISA-Platten bei verschiedenen pH-Werten mit seriellen Verdünnungen des gereinigten Proteins inkubiert und die Zellyse gemessen. Gereinigtes p60 besaß bakteriolytische Aktivität über einen breiten pH-Bereich (Abb. 18). Die höchste Aktivität wurde bei pH 7 gemessen, Zellyse fand jedoch auch noch unter relativ sauren (pH 5) und alkalischen (pH 9,5) Bedingungen statt. Der Oxidationsgrad des Puffers schien für die Aktivität von p60 - im Gegensatz zu LLO - keine Rolle zu spielen, da die Zugabe von DTT die Lyse nicht beeinflusste.

Um sicherzustellen, daß die beobachtete Bakterienlyse durch p60 und nicht durch evtl. kontaminierende Peptide verursacht worden war, wurde gereinig-

### 3.4 Inhibition der MHC II-abhängigen T-Zell-Stimulierung

Im Maussystem konnte gezeigt werden, daß *L. monocytogenes* in der Lage ist, die MHC II-abhängige Antigen-Präsentation so zu beeinflussen, daß Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Proliferation inhibiert werden. Hierfür war das durch die Listerien produzierte Listeriolysin verantwortlich. T-Zell-Inhibition konnte auch durch Behandlung Antigen-präsentierender Zellen mit geringtem LLO induziert werden. Solchermaßen behandelte APC präsentierten Antigene in einer Weise, die zur partiellen T-Zell-Anergisierung führte ((224, 225) und Darji et al., Manuskript in Vorbereitung). Dieser Effekt konnte mit allen bis dahin im Maussystem getesteten APC und mit einer Vielzahl verschiedener Antigene beobachtet werden (vgl. Kap. 1.4.3). Die nachfolgend beschriebenen Versuche sollten klären, ob und wenn ja, wie *L. monocytogenes* im Humansystem T-Zell-Inhibition induziert.

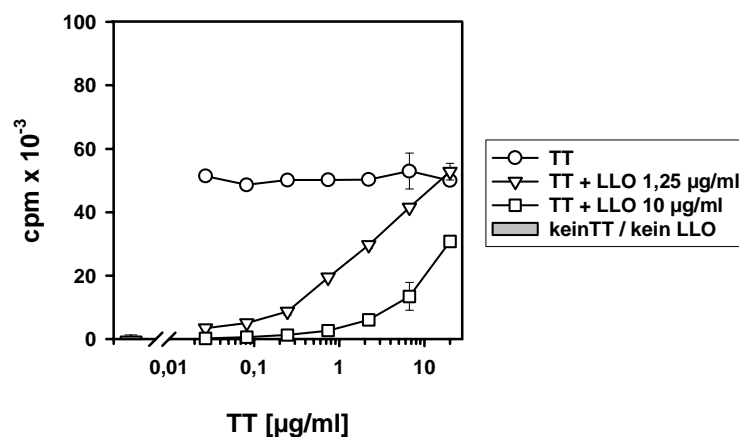
Als Modellantigen wurde Tetanus-Toxoid (TT) gewählt, da es aufgrund der allgemein üblichen Tetanus-Impfungen relativ einfach ist, aus gesunden Spendern TT-spezifische T-Zellklone zu isolieren. Außerdem waren für dieses Antigen bereits eine Reihe von Peptiden bekannt, die von T-Zellen erkannt werden. Diese Peptide haben teilweise die Eigenschaft, an mehrere verschiedene HLA-DP- oder DR-Allele zu binden (106). Daher war die Wahrscheinlichkeit sehr groß, auch aus Spendern mit unbekanntem HLA T-Zellklone zu isolieren, die eines dieser Epitope (p2 oder p30, vgl. Kap. 2.11.1) erkannten. Für einige der nachfolgend beschriebenen Versuche war die Kenntnis des T-Zell-Epitops eine Voraussetzung. Die benutzten T-Zellklone sowie deren Herstellung sind in Kap. 2.11.5 bzw. 2.11.4 beschrieben.

#### 3.4.1 LLO beeinträchtigt die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch PBMC

Zunächst wurde geklärt, ob die Behandlung humaner Antigen-präsentierender Zellen mit LLO deren Fähigkeit, Antigen zu prozessieren und spezifische T-Zellen zu stimulieren, beeinflußt. Dazu wurden zunächst PBMC als APC im Inhibitionstest (Kap. 2.12.3) eingesetzt. Die bestrahlten (8000 rad) PBMC wurden 15 Minuten mit LLO in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, gewaschen und anschließend mit Tetanus-Toxin als Antigen inkubiert. Nach vier Stunden wurden TT-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Klon SZL TT/42) zugegeben, deren Proliferation später gemessen wurde. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der PBMC-Behandlung mit 1,25 bzw. 10 µg/ml LLO.

LLO-behandelte PBMC waren nicht in der Lage, spezifische T-Zellen so effektiv zu stimulieren wie unbehandelte APC. Während diese die T-Zellen bereits bei einer TT-Konzentration von 0,03 µg/ml maximal stimulierten, benötigten PBMC, die mit 1,25 µg/ml LLO behandelt worden waren, hierfür eine

ca. 670-fach höhere Antigen-Konzentration. Bei PBMC, die mit 1,25  $\mu\text{g/ml}$  LLO behandelt worden waren, konnte die Störung der T-Zell-Stimulation also durch hohe Antigen-Dosen wieder ausgeglichen werden. Bei 10  $\mu\text{g/ml}$  LLO war dies nicht vollständig möglich (Abb. 19). Bei weiterer Erhöhung der LLO-Konzentration wurden die PBMC durch die lytische Aktivität von LLO irreversibel geschädigt und konnten die T-Zellen nicht mehr stimulieren (Daten nicht gezeigt). In folgenden Experimenten wurde mit LLO-Konzentrationen gearbeitet, bei denen durch Erhöhung der Antigen-Dosis die Stimulation der T-Zellen voll wiederhergestellt werden konnte. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß die beobachteten Effekte nicht einfach auf die Lyse der Antigen-präsentierenden Zellen zurückzuführen waren.



**Abb. 19.** Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch LLO-behandelte PBMC.

### 3.4.2 Verschiedene APC reagieren unterschiedlich sensitiv auf LLO

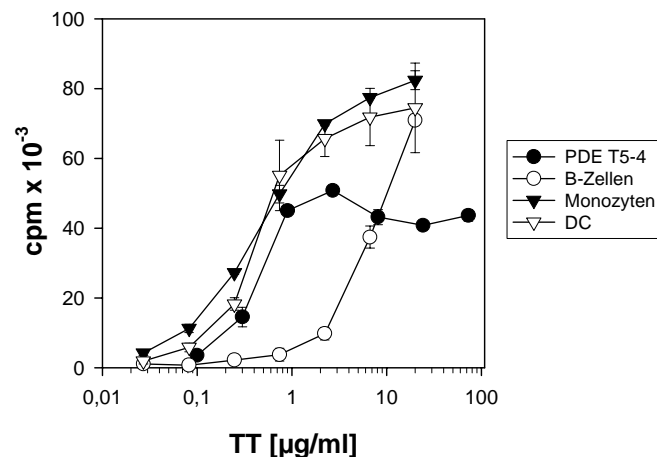
Im peripheren Blut sind eine Vielzahl unterschiedlicher Antigen-präsentierender Zellen enthalten. Diese könnten unterschiedlich sensitiv auf die Behandlung mit LLO reagieren. Möglicherweise könnten daher bestimmte Zelltypen irreversibel geschädigt werden, während andere unbeeinträchtigt bleiben und die T-Zellen normal stimulieren. Da spezifische T-Zellen durch verschiedene APC-Populationen (z.B. Monozyten oder B-Zellen) stimuliert werden können, könnte die in Abb. 19 gezeigte verringerte Kapazität zur T-Zell-Stimulation nach LLO-Behandlung von PBMC auch durch den kompletten Ausfall einer dieser Zellpopulationen erklärt werden.

Daher wurden verschiedene Typen professioneller Antigen-präsentierender Zellen - Monozyten, dendritische Zellen und B-Zellen - isoliert. Monozyten und dendritische Zellen nehmen Antigene unspezifisch über Pinozytose auf und präsentieren sie T-Zellen. Allerdings können sie bestimmte glykosylierte Antigene auch über den Mannose-Rezeptor aufnehmen (255). B-Zellen können Antigene sowohl unspezifisch über Pinozytose als auch spezifisch über den membranständigen B-Zell-Rezeptor aufnehmen. Im letzteren Fall stimulieren sie T-Zellen weitaus stärker, da die Rezeptor-vermittelte Endozytose effektiver ist (256). Direkt aus dem Blut isolierte B-Zellen sollten Tetanus-Toxin größtenteils unspezifisch aufnehmen und präsentieren, da der Anteil TT-spezifischer B-Zellen, welche dieses Antigen mit Hilfe des membranständigen B-Zell-Rezeptors aufnehmen könnten, relativ klein sein sollte und damit nicht ins Gewicht fiel. Zusätzlich wurden deshalb TT-spezifische, EBV-transformierte B-Zellen etabliert und als APC im Inhibitionstest eingesetzt. Damit sollte geklärt werden, ob LLO die Präsentation von Antigenen, welche unspezifisch oder Rezeptor-vermittelt aufgenommen werden, in gleicher Weise stört.

Monozyten wurden aus PBMC über ihre Adhärenz an Plastik isoliert. Um dendritische Zellen zu erhalten, wurden Monozyten 5 bis 8 Tage in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die hier benutzten dendritischen Zellen besaßen einen unreifen Phänotyp (vgl. Kap. 2.11.3), d.h. sie waren in der Lage, Antigene effizient aufzunehmen und zu prozessieren ((6), Daten nicht gezeigt). B-Zellen wurden durch negative Selektion aus der nicht-adhärenten Fraktion der PBMC gewonnen, indem alle T-Zellen eliminiert wurden. Zur Etablierung des TT-spezifischen EBV-B-Zellklons PDE T5-4 siehe Kap. 2.11.7.

Der Vergleich der stimulatorischen Kapazität der unterschiedlichen APC zeigte, daß Monozyten und dendritische Zellen den TT-spezifischen T-Zellklon SZL TT/42 mit ähnlicher Effektivität stimulierten, während B-Zellen eine ca. 15-fach höhere Antigen-Konzentration benötigten, um die T-Zellen halb-maximal zu stimulieren (Abb. 20). Dabei ist zu beachten, daß 20-mal mehr B-Zellen als DC oder Monozyten eingesetzt wurden ( $2 \times 10^5$ /Loch gegenüber  $1 \times 10^4$ /Loch). TT-spezifische EBV-transformierte B-Zellen ( $2 \times 10^4$ /Loch) waren in der Antigen-Präsentation ähnlich effektiv wie DC und Monozyten; alle stimulierten die T-Zellen bei einer TT-Konzentration von  $0,4 \mu\text{g/ml}$  halb-maximal, wenn auch die maximale T-Zell-Proliferation mit EBV-transformierten B-Zellen geringer ausfiel. Dies könnte durch den hohen Stoffwechselumsatz und den damit verbundenen Verbrauch der Nährstoffe im Medium durch EBV-transformierte B-Zellen bedingt sein.

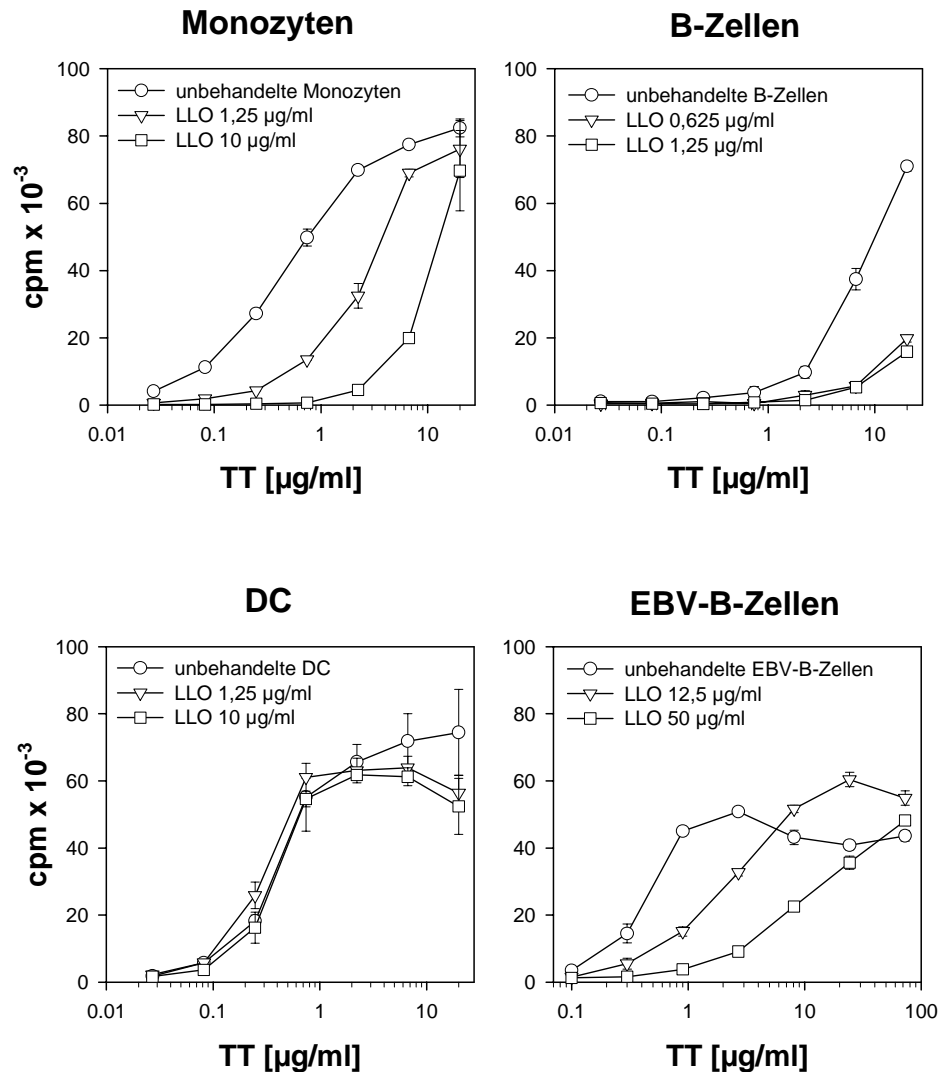




**Abb. 20.** Vergleich der T-Zell-Stimulation mit unterschiedlichen APC. Dendritische Zellen, Monozyten und B-Zellen wurden aus dem Blut desselben Spenders isoliert, aus dem auch der T-Zellklon SZL TT/42 stammt. Der TT-spezifische EBV-transformierte B-Zell-Klon PDE T5-4 wurde aus heterologem Blut isoliert. Er präsentiert das Epitop p30 aus TT DP4-restringiert.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen im Inhibitionstest zeigte sich, daß die LLO-Behandlung bei Monozyten und B-Zellen dazu führte, daß sie spezifische T-Zellen weniger gut stimulierten. Während bei Monozyten, wie vorher bei PBMC, die T-Zell-Stimulation durch hohe Antigen-Konzentrationen wiederhergestellt werden konnte, war dies bei B-Zellen nicht der Fall. Daher wäre es möglich, daß letztere durch die LLO-Behandlung abgetötet worden waren (Abb. 21). Dendritische Zellen und EBV-transformierte B-Zellen (Klon PDE T5-4) waren gegenüber der LLO-Behandlung erstaunlich resistent. DC konnten den T-Zellklon SZL TT/42 auch nach Behandlung mit 10 µg/ml LLO normal stimulieren. Bei EBV-transformierten B-Zellen war eine LLO-Konzentration von 50 µg/ml nötig, um die T-Zell-Stimulation zu beeinträchtigen. Auch hier wurden die T-Zellen bei erhöhten Antigen-Konzentrationen normal stimuliert, allerdings mußte diese 100-fach erhöht werden (Abb. 21).

Da auch mit gereinigten Monozyten und EBV-transformierten, Antigen-spezifischen B-Zellen die durch LLO induzierte Störung der T-Zellstimulation durch erhöhte Antigen-Konzentrationen wieder ausgeglichen werden konnte, war ausgeschlossen, daß die zuvor mit PBMC beobachteten Effekte ausschließlich auf die irreversible Schädigung einzelner APC-Populationen zurückzuführen sein könnten. Darüber hinaus wurde die Antigen-Präsentation sowohl nach Aufnahme durch Pinozytose (Monozyten) als auch durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (EBV-B-Zellen) gestört. Die unterschiedliche Sensitivität dendritischer Zellen und Monozyten gegenüber der Behandlung mit LLO war dabei besonders interessant, da die dendritischen Zellen durch *in vitro*-Differenzierung aus Monozyten isoliert worden waren. Trotz der engen Verwandtschaft der beiden APC-Typen reagierten diese im Inhibitionstest völlig unterschiedlich.

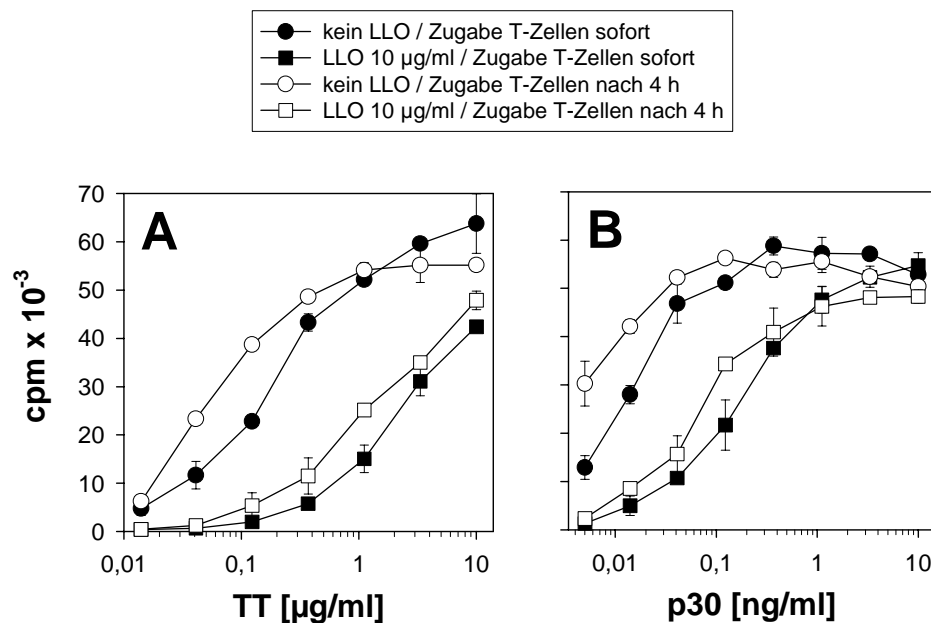


**Abb. 21.** Einfluß der LLO-Behandlung auf die T-Zell-Stimulation durch unterschiedliche APC. Monozyten und B-Zellen inhibieren nach Behandlung mit LLO die T-Zell-Proliferation. Dendritische Zellen und EBV-transformierte B-Zellen sind gegen LLO-Behandlung resistent und induzieren keine Inhibition. Der T-Zellklon SZL TT/42 wurde mit autologen Monozyten ( $1 \times 10^4$ /Loch), B-Zellen ( $2 \times 10^5$ /Loch), DC ( $1 \times 10^4$ /Loch) oder TT-spezifischen EBV-transformierten B-Zellen (PDE T5-4,  $2 \times 10^4$ /Loch) inkubiert. Die APC waren mit den angegebenen Mengen LLO behandelt und mit unterschiedlichen TT-Konzentrationen inkubiert worden, bevor die T-Zellen zugegeben wurden.

### 3.4.3 Die Störung der T-Zell-Stimulation durch LLO beruht in Mensch und Maus auf unterschiedlichen Mechanismen

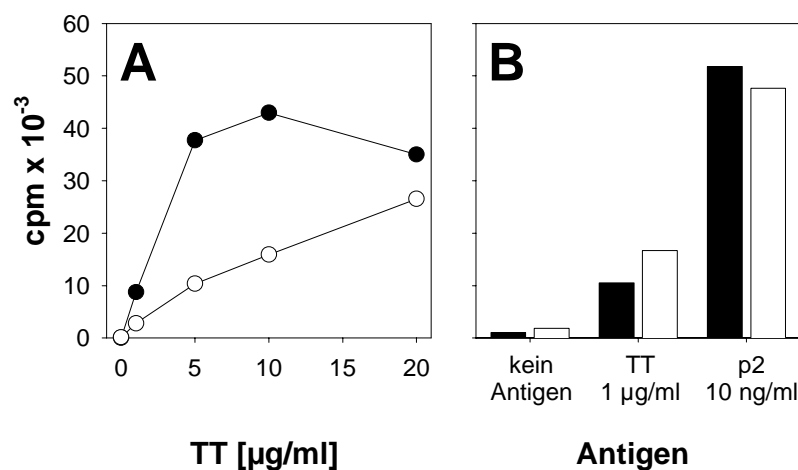
Experimente im Maussystem hatten gezeigt, daß die Behandlung Antigen-präsentierender Zellen mit LLO zu einer veränderten Antigen-Prozessierung führte. Obwohl dort der Mechanismus der Inhibition noch nicht endgültig aufgeklärt wurde, lagen Hinweise vor, daß mit LLO behandelte APC weiterhin Antigen prozessierten, jedoch in einer Weise, die eine Anergisierung spezifischer T-Zellen (Inhibition) verursachte. Eine Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens war, daß statt stimulatorischer MHC II/Peptid-Komplexe nun inhibitorische MHC II/Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen transportiert wurden. Ob diese ein modifiziertes T-Zell-Epitop trugen oder einfach eine veränderte Konformation besaßen, war unbekannt. Jedenfalls erforderte die Bildung solcher inhibitorischer Komplexe eine längere Prozessierungszeit als die Bildung stimulatorischer MHC II-Komplexe. Außerdem war keine Inhibition zu beobachten, wenn statt des nativen Antigens synthetische Peptide eingesetzt wurden. Diese banden vermutlich, ohne vorher prozessiert zu werden, an "normale" MHC II-Komplexe, welche sich auf der Oberfläche der APC befanden, weshalb die T-Zellen normal stimuliert werden. Der inhibitorische Effekt war dabei dominant gegenüber der Stimulation mit Peptid: APC, die nach LLO-Behandlung und Prozessierung nativen Antigens zusätzlich mit Peptid beladen wurden, inhibierten trotzdem die T-Zell-Stimulation (224, 225).

Es war zu klären, ob die durch LLO induzierte Störung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation im Menschen einem ähnlichen Mechanismus wie in der Maus unterlag. Daher wurde zunächst untersucht, welchen Einfluß die Zeit der Antigen-Prozessierung durch LLO-behandelte Monozyten auf deren Fähigkeit hatte, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren. Falls LLO in humanen Monozyten - wie in murinen APC - die Bildung inhibitorischer MHC II-Komplexe induzierte, sollte auch hier deren Bildung durch eine längere Prozessierungszeit begünstigt werden. Gleichzeitig wurde untersucht, ob durch Zugabe synthetischer Peptide die T-Zell-Stimulation wiederhergestellt werden konnte. Im Inhibitionsassay wurden die T-Zellen entweder, wie in den vorhergegangenen Experimenten, vier Stunden oder sofort nach LLO-Behandlung der APC und Zugabe des Antigens, entweder nativem TT oder dem synthetischen Peptid p30, eingesetzt (Abb. 22). LLO-behandelte Monozyten inhibierten die T-Zell-Proliferation sowohl in Gegenwart des nativen Antigens (Abb. 22A) als auch des Peptids p30 (Abb. 22B), dem durch SZL TT/42 erkannten Epitop. Die Prozessierungszeit hatte in beiden Fällen keinen Einfluß auf die T-Zell-Stimulation. Eine Veränderung der Antigen-Prozessierung durch LLO, die zur Bildung inhibitorischer MHC II-Komplexe führte, wurde daher ausgeschlossen. Da auch die Präsentation synthetischer Peptide gestört war, schien LLO in humanen Monozyten eher generell die Antigen-Präsentation zu unterdrücken.



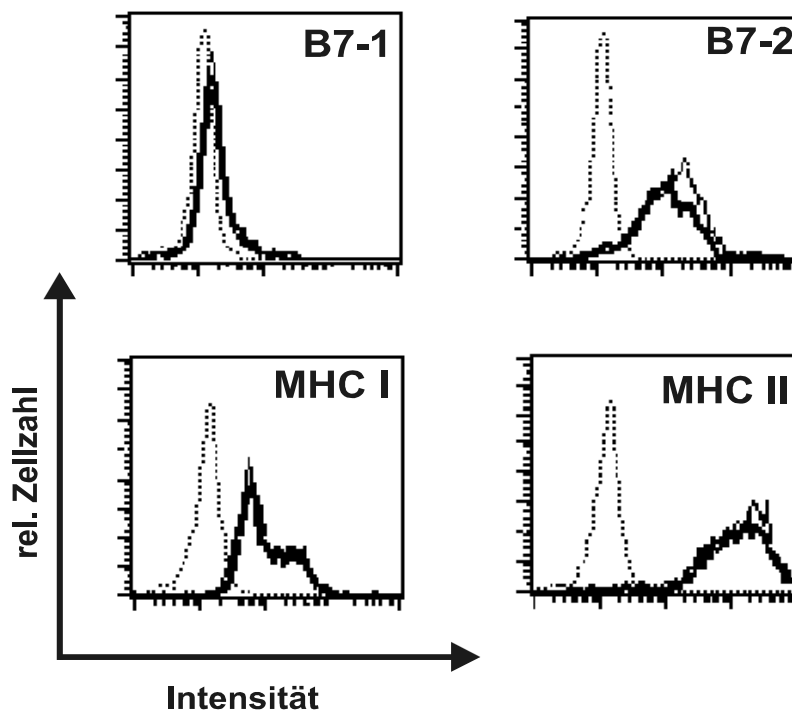
**Abb. 22.** Die Prozessierungszeit hat keinen Einfluß auf die T-Zell-Stimulation bzw. -Inhibition. Der T-Zellklon SZL TT/42 wurde mit LLO-behandelten autologen Monozyten in Gegenwart von TT (A) oder p30 (B) inkubiert. Die T-Zellen wurden entweder 4 Stunden (offene Symbole) oder sofort (geschlossene Symbole) nach LLO-Behandlung und Inkubation mit Antigen zugegeben.

Zur weiteren Charakterisierung des von LLO vermittelten Effektes wurde untersucht, ob die LLO-Behandlung Antigen-präsentierender Zellen zur Anergisierung spezifischer T-Zellen führt. PBMC wurden wie in den vorhergehenden Experimenten mit LLO behandelt, gewaschen und mit Tetanus-Toxoid inkubiert. Nach vier Stunden wurden spezifische T-Zellen (Klon PDE-p2/65) zugegeben. Wie schon zuvor, war auch die Proliferation dieses T-Zellklons, der das Epitop p2 erkennt, gestört (Abb. 23A). Zellen desselben Klons, die parallel genauso behandelt worden waren (mit unbehandelten/LLO-behandelten PBMC und 5 µg/ml TT), wurden nach Ablauf einer Woche erneut stimuliert, diesmal mit normalen PBMC. Als Antigen wurde TT oder synthetisches p2 zugegeben (Abb. 23B). Die T-Zellen proliferierten in gleicher Weise, unabhängig davon, ob sie zuvor mit LLO-behandelten oder unbehandelten PBMC stimuliert worden waren. Die LLO-Behandlung der APC führte also nicht zur Induktion von Anergie in den T-Zellen.



**Abb. 23.** Die Stimulation mit LLO-behandelten PBMC führt nicht zur T-Zell-Anergie. A) Der TT-spezifische T-Zellklon PDE-p2/65 wurde mit LLO-behandelten (○) (1 µg/ml) oder unbehandelten (●) autologen PBMC und Tetanus-Toxoid stimuliert. LLO-behandelte PBMC inhibierten die T-Zell-Proliferation. B) T-Zellen, die parallel zu Experiment A mit LLO-behandelten oder unbehandelten PBMC und 5 µg/ml TT stimuliert worden waren, wurden nach 6 Tagen erneut autologen PBMC (ohne LLO-Behandlung) und Tetanus-Toxoid oder p2 restimuliert und die Proliferation gemessen (■ 1. Stimulation mit unbehandelten PBMC. □ 1. Stimulation mit LLO-behandelten PBMC). Obwohl die LLO-Behandlung der PBMC zunächst zur Inhibition der T-Zell-Proliferation geführt hatte (A), konnten diese T-Zellen nach Ablauf einer Woche normal stimuliert werden.

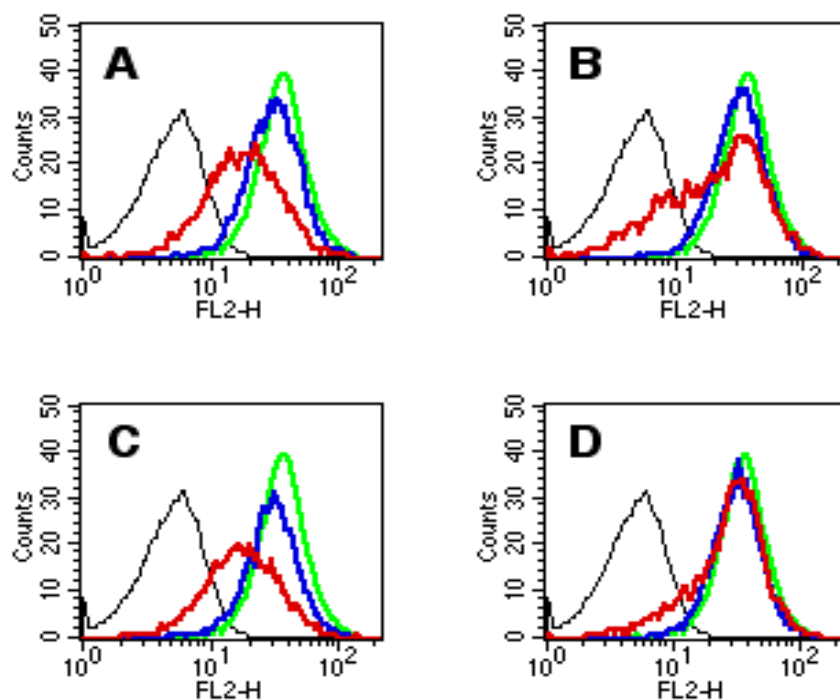
Eine mögliche Erklärung für die verringerte T-Zell-Aktivierung nach Behandlung der APC mit LLO könnte eine gestörte Expression von MHC II- oder kostimulatorischen Molekülen sein. Daher wurden LLO-behandelte Monozyten zytofluorometrisch auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 sowie von MHC I und II geprüft. Die B7-Moleküle haben unmittelbaren Einfluß auf die T-Zell-Stimulation, da beide auf T-Zellen an CD28 binden, welches der T-Zelle das zur vollständigen Aktivierung benötigte zweite Signal liefert. Eine Herabregulierung von MHC II hätte ebenfalls eine verringerte T-Zell-Stimulation zur Folge. Es zeigte sich jedoch, daß die Expression von MHC II sowie von B7-1 durch LLO nicht wesentlich beeinflusst wurde (Abb. 24). Lediglich eine schwache Herabregulierung von B7-2 wurde beobachtet (Abb. 24). Die Proliferation TT-spezifischer T-Zellen ließ sich allerdings durch Blockierung von B7-2 auf Antigen-präsentierenden Zellen durch spezifische Antikörper nicht hemmen (Daten nicht gezeigt). Vermutlich reichte die eingesetzte Menge der Antikörper nicht zur vollständigen Blockierung aus. Daher erschien es unwahrscheinlich, daß die verminderte T-Zell-Stimulation durch eine solch geringfügige schwächere B7-2-Expression auf LLO-behandelten Monozyten, wie sie in der FACS-Analyse beobachtet worden war, hervorgerufen werden sollte. Insgesamt wurde deshalb eine gestörte Expression von MHC- oder kostimulatorischen Molekülen als Ursache für die verringerte T-Zell-Proliferation ausgeschlossen.



**Abb. 24.** Die LLO-Behandlung von Monozyten hat keinen Einfluß auf die Expression von B7-1, B7-2, MHC I oder MHC II. Monozyten wurden für 15 Minuten mit 10 µg/ml LLO behandelt, gewaschen und nach 4 Stunden Inkubation mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Alle Antikörper waren direkt-markiert (FITC oder PE). Gepunktet: Kontrolle ohne Antikörper; einfach: kein LLO; fett: LLO 10 µg/ml

Die bisherigen Ergebnisse hatten keine Hinweise geliefert, daß LLO, wie im Maussystem, die Antigen-Prozessierung in einer Weise veränderte, die zu einer spezifischen T-Zell-Inhibition führte. Ebenso war die Expression kostimulatorischer Moleküle sowie MHC II durch LLO nicht beeinträchtigt worden. Eine mögliche Erklärung der Daten wäre, daß LLO eventuell aufgrund seiner porenbildenden Eigenschaften die Antigen-Prozessierung generell störte. Eine beeinträchtigte Prozessierung würde dazu führen, daß weniger Epitope auf MHC II geladen werden, was wiederum zur Folge hätte, daß auf der T-Zelle weniger T-Zell-Rezeptoren ihr Antigen erkennen und die Zelle nicht vollständig aktiviert wird.

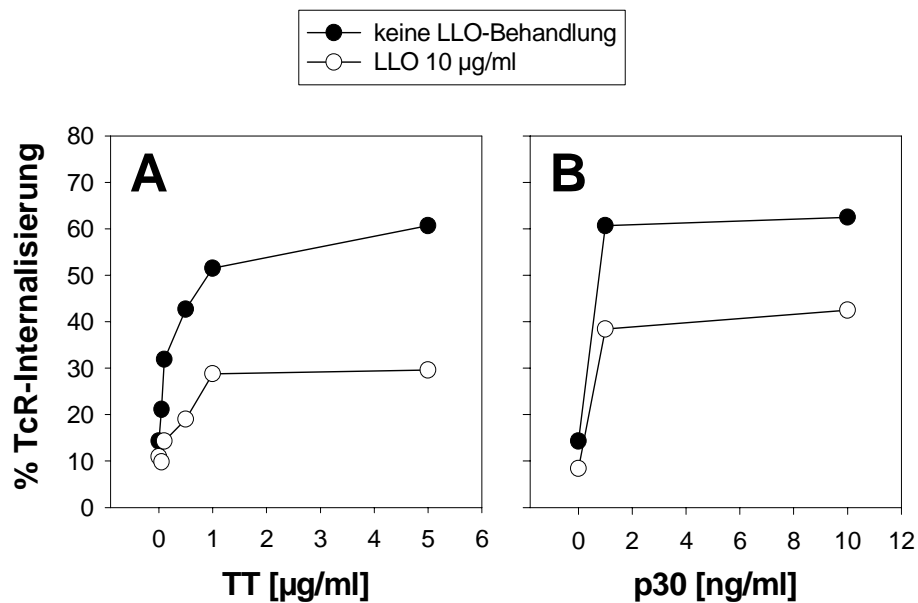
Die Erkennung des MHC II/Peptid-Komplexes auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen führt normalerweise zu einer Internalisierung der T-Zell-Rezeptoren (120). Deshalb wurden TT-spezifische T-Zellen mit LLO-behandelten APC (Monozyten oder DC) und Antigen stimuliert und die TcR-Internalisierung indirekt mit Hilfe CD3-spezifischer Antikörper im Durchflußzytometer gemessen (Kap. 2.12.4). Abb. 25 zeigt die TcR-Expression für eine Antigen-Konzentration (1 µg/ml TT) nach Stimulation mit LLO-behandelten oder unbehandelten DC oder Monozyten. Die TcR-Internalisierung zeigt sich in einer Abnahme der Intensität. Mit Hilfe des geometrischen Mittelwerts der Fluoreszenz-Intensität wurde die Internalisierung des TcR berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 und 27 dargestellt.



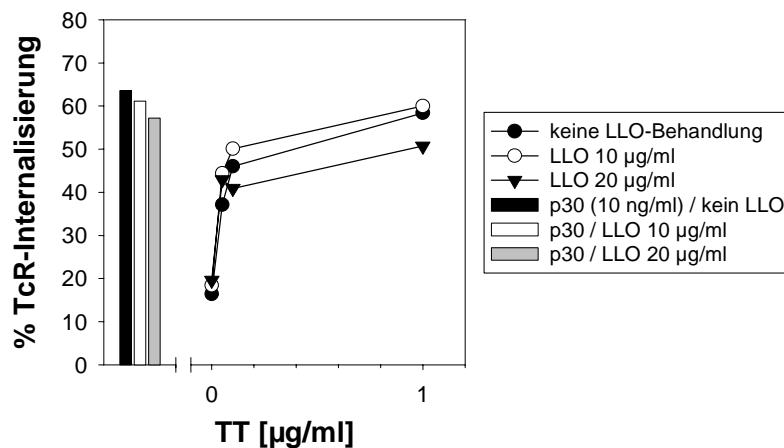
**Abb. 25.** Messung der TcR-Internalisierung im Zytofluorometer. TT-spezifische T-Zellen (Klon SZL TT/42) wurden mit unbehandelten (A,B) oder LLO-behandelten (10 µg/ml; C,D) Monozyten (B,D) oder dendritischen Zellen (A,C) stimuliert und der TcR mit Hilfe eines CD3-spezifischen Antikörpers angefärbt. Gezeigt ist die Expression von CD3 auf den T-Zellen. Antigen-präsentierende Zellen wurden aufgrund ihrer Lage im Vowärts/Seitwärts-Scatter sowie ihrer Markierung mit BCECF ausgeschlossen. schwarz: Kontrolle ohne Antikörper; grün: positiv-Kontrolle (nur T-Zellen); blau: T-Zellen plus APC ohne Antigen; rot T-Zellen plus APC und Antigen (1 µg/ml TT).

Es zeigte sich, daß die Behandlung von Monozyten mit LLO zu einer Inhibierung der TcR-Internalisierung auf den T-Zellen führte (Abb. 25). Während nach Stimulation der T-Zellen mit normalen, Antigen-beladenen Monozyten ca. 60 % der T-Zell-Rezeptoren internalisiert wurden, waren es nach LLO-Behandlung der Monozyten nur noch 30 % mit TT bzw. 40 % mit p30 (Abb. 26). Wiederum trat der inhibitorische Effekt sowohl mit nativem Protein als auch mit Peptid als Antigen auf. Dendritische Zellen hingegen, welche gegen die von LLO vermittelten Effekte resistent waren, stimulierten T-Zellen in normaler Weise (Abb. 25). Sowohl unbehandelte als auch mit LLO vorbehandelte dendritische Zellen induzierten nach Beladung mit Antigen eine Internalisierung von ca. 60 % der T-Zell-Rezeptoren (Abb. 27).

Die verringerte TcR-Internalisierung auf T-Zellen, die mit LLO-behandelten Monozyten inkubiert worden waren, korrelierte mit der zuvor beobachteten Störung der T-Zell-Proliferation. Sie deutete auf eine generell gestörte Antigen-Prozessierung hin, die in einer verringerten Zahl von Epitop-beladenen MHC II-Molekülen auf der Oberfläche der APC und einer dementsprechend schwächeren TcR-Internalisierung resultierte. Darüber hinaus zeigte sich auch in diesen Experimenten die Resistenz dendritischer Zellen gegen LLO.



**Abb. 26.** Inhibition der TcR-Internalisierung durch LLO-behandelte Monozyten. Monozyten wurden mit 10  $\mu\text{g/ml}$  LLO behandelt, gewaschen, mit TT (A) oder p30 (B) beladen und zur Stimulation des T-Zellklons SZL TT/42 benutzt. Nach zwei Stunden wurde die Internalisierung des T-Zell-Rezeptors mit Hilfe eines CD3-spezifischen Antikörpers gemessen.

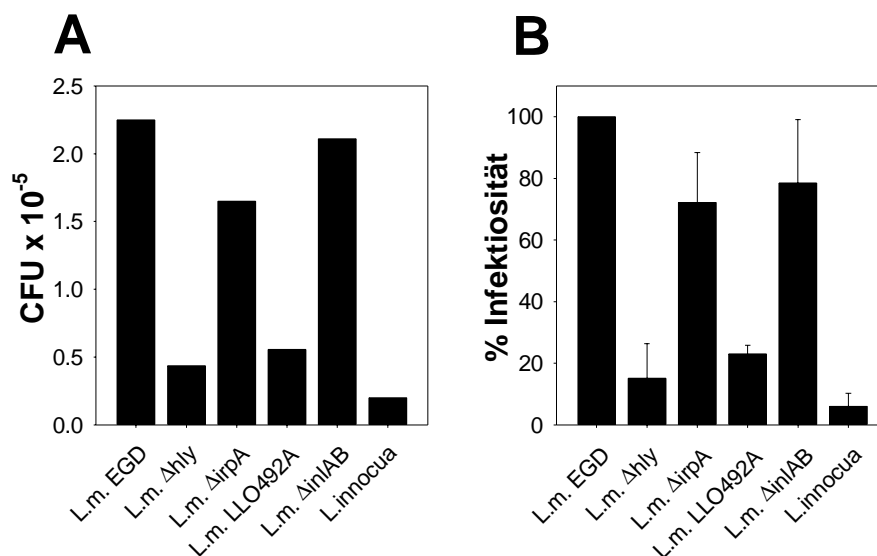


**Abb. 27.** Die TcR-Internalisierung wird durch LLO-behandelte dendritische Zellen nicht inhibiert. Dendritische Zellen wurden mit den angegebenen Mengen LLO behandelt, gewaschen, mit TT oder p30 beladen und zur Stimulation des T-Zellklons SZL TT/42 benutzt. Nach zwei Stunden wurde die Expression des TcR mit Hilfe CD3-spezifischer Antikörper im FACS analysiert.

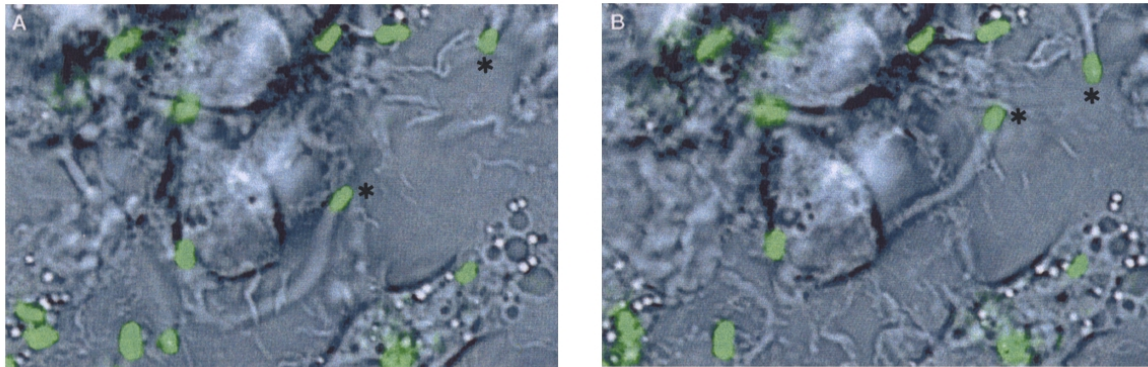


### 3.5 Infektion dendritischer Zellen mit *L. monocytogenes*

Humane dendritische Zellen hatten sich in den bisherigen Experimenten als sehr resistent gegen die von Listeriolysin vermittelten inhibitorischen Effekte erwiesen. LLO spielt gleichzeitig im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* eine zentrale Rolle beim Ausbruch der Bakterien aus den Phagosomen. Es war daher zu klären, ob humane DC überhaupt von *L. monocytogenes* infiziert werden können und welche Virulenzfaktoren dabei eine Rolle spielen. Dazu wurden dendritische Zellen mit *L. monocytogenes* und verschiedenen Mutanten infiziert, extrazelluläre Listerien abgetötet und die Zahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Es zeigte sich, daß *L. monocytogenes* offensichtlich in der Lage war, auch humane dendritische Zellen zu infizieren (Abb. 28). Die Expression von LLO scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, da die Mutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2 eine um ca 75 % verringerte Infektionseffizienz besaß (Abb. 28B). Ebenso wenig waren isogene Mutanten, die eine ahämolytische Form des Listeriolysin (LLO492A) exprimierten, in der Lage, dendritische Zellen effizient zu infizieren. Internalin A und B sowie das ihnen verwandte IrpA schienen dagegen kaum eine Rolle bei der Infektion dendritischer Zellen zu spielen. Interessanterweise war die absolute Infektionseffizienz, gemessen an der Zahl intrazellulärer Bakterien, vom Spender abhängig, aus dem die dendritischen Zellen isoliert worden waren. Sie schwankte zwischen  $2 \times 10^5$  und  $8 \times 10^6$  für *L. m.* EGD (nicht gezeigt). Allerdings war die relative Infektiosität der verschiedenen Listerien-Stämme vom Spender unabhängig (Abb. 28B).

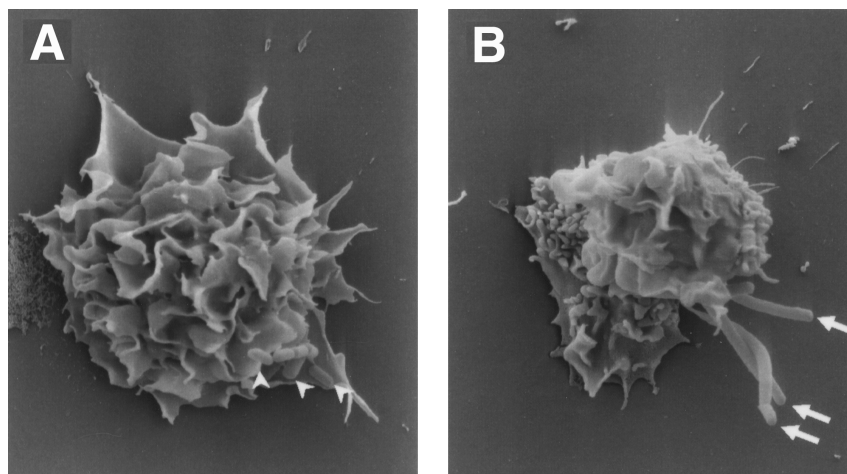


**Abb. 28.** Infektion dendritischer Zellen durch verschiedene Listerien-Stämme.  $2,5 \times 10^5$  dendritische Zellen wurden mit  $1,25 \times 10^6$  Bakterien für drei Stunden infiziert. Nach einstündiger Inkubation mit 20 µg/ml Gentamycin zur Abtötung extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen gewaschen, mit PBS + 0,2 % NP-40 lysiert und die Lysate ausplattiert. (A) zeigt die Ergebnisse für einen Spender. Die Zahl der colony-forming units war stark vom Spender abhängig und lag zwischen  $2 \times 10^5$  und  $8 \times 10^6$  für *L.m.* EGD (nicht gezeigt). (B) Die relative Infektionsrate der unterschiedlichen Listerien-Stämme war vom Donor unabhängig. Hier wurden die Daten von 4 unterschiedlichen Spendern zur Ermittlung der relativen Infektiosität, bezogen auf *L. monocytogenes*, zusammengefaßt.



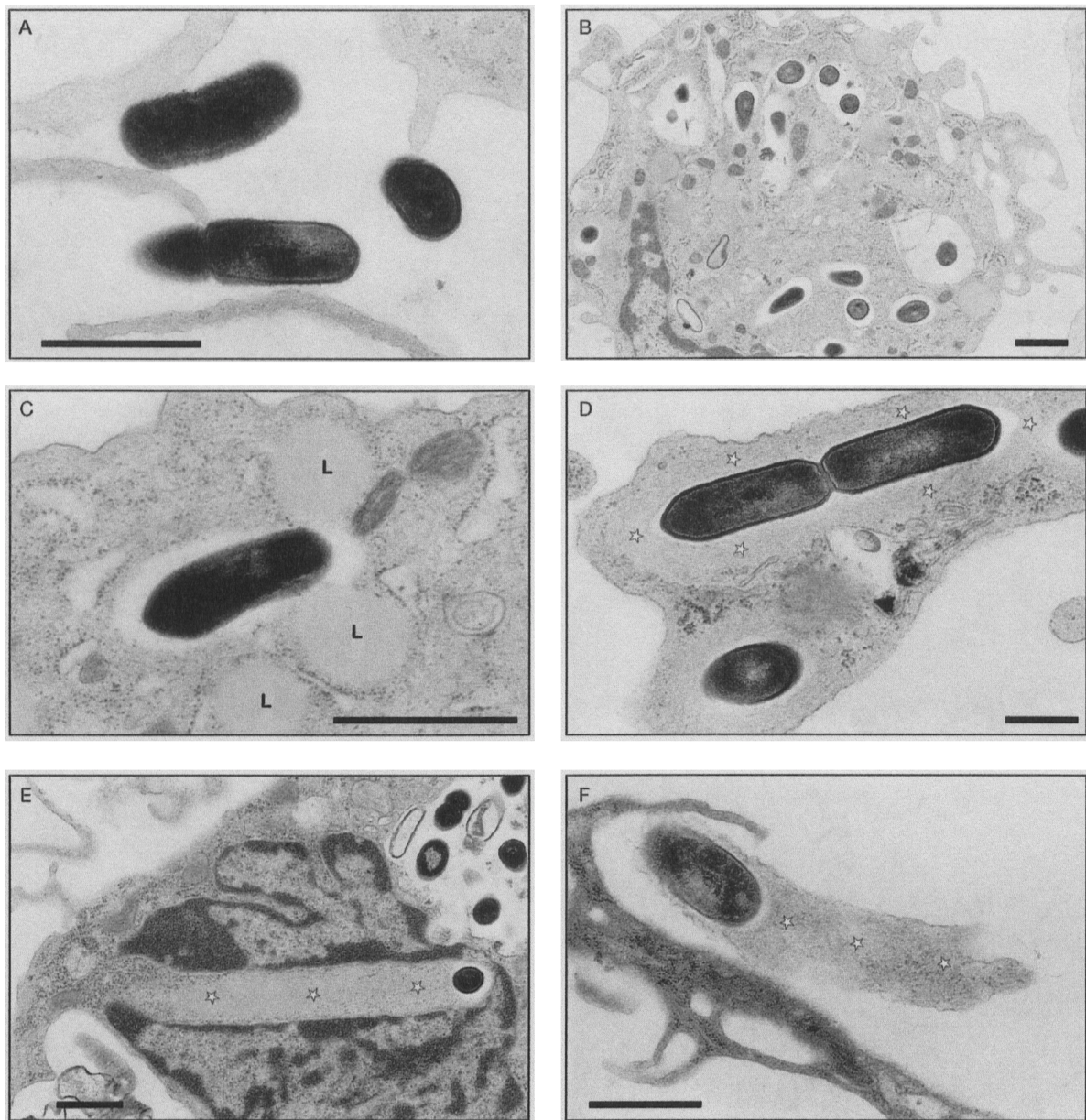
**Abb. 29.** *Listeria monocytogenes* entkommt nach Infektion dendritischer Zellen aus dem Phagosom. GFP-exprimierende *L. monocytogenes* wurden zur Infektion humaner dendritischer Zellen benutzt und der Verlauf der Infektion durch konfokale Lichtmikroskopie verfolgt. Zwei Zeitpunkte der Infektion sind gezeigt (A und B). Deutlich sind zwei Protrusionen (Sternchen) mit endständigen Bakterien (grün) zu erkennen. Die Aufnahmen wurden von K. Dittmar, GBF, angefertigt.

Die Bestimmung der Anzahl lebender Listerien nach Infektion und Lyse dendritischer Zellen hatte gezeigt, daß *L. monocytogenes* in der Lage war, diese zu infizieren, wobei Listeriolysin eine wichtige Rolle zu spielen schien. Allerdings erlaubten diese Experimente keine sichere Aussage darüber, ob die Bakterien in der Lage waren, das Phagosom zu verlassen und in das Zytosol einzudringen. Daher wurden zunächst Green Fluorescent Protein (GFP)-exprimierende *L. monocytogenes* zur Infektion dendritischer Zellen verwendet und diese im konfokalen Lichtmikroskop analysiert. Nach Überlagerung von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen waren schlauchförmige Gebilde („Protrusions“) zu erkennen, an deren Ende sich fluoreszierende Bakterien befanden (Abb. 29). Diese waren auch in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen *L. m.* EGD-infizierter dendritischer Zellen zu erkennen (Abb. 30).



**Abb. 30.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zweier mit *L. monocytogenes* infizierter dendritischer Zellen. Links sind Bakterien zu erkennen, die sich vermutlich noch auf der Zelloberfläche befinden (Pfeilspitzen), rechts Protrusions (Pfeile). Die Aufnahmen wurden von M. Rohde und K. Dittmar, GBF, angefertigt.

Die Bildung dieser Protrusions zeigte, daß *L. monocytogenes* in der Lage war, das Phagosom nach Aufnahme durch dendritische Zellen zu verlassen.

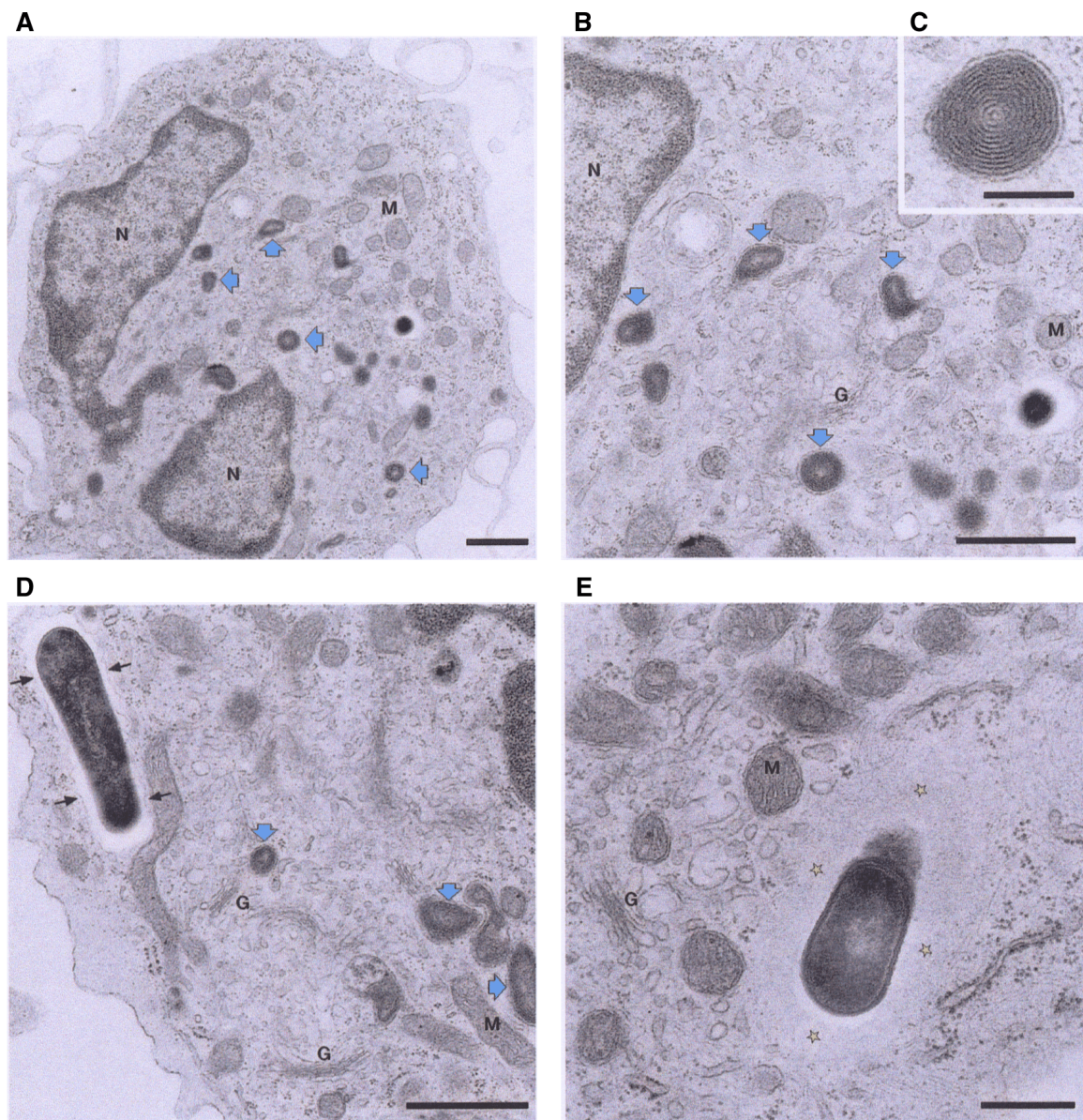


**Abb. 31.** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen Listerien-infizierter dendritischer Zellen. DC wurden mit *L. monocytogenes* infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Präparate angefertigt. A) Beginn des Infektionszyklus: Listerien außerhalb der Zellen. B) In der frühen Phase der Infektion befinden sich die meisten Listerien in Phagosomen. C) Fusion von Lysosomen mit Phagosomen. D) In späteren Phasen finden sich zytosolische Bakterien, welche Aktin akkumulieren (Sternchen). E) Einzelne Bakterien bilden Aktinschweife. F) Infektion einer benachbarten dendritischen Zelle. Die Aufnahmen wurden von M. Rohde, GBF, angefertigt. Maßstäbe: 0,5 µm.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen *L. monocytogenes*-infizierter dendritischer Zellen zeigten, daß die Listerien in diesen Zellen den vollen Infektionszyklus durchliefen (Abb. 31). Die Bakterien befanden sich in der frühen Phase der Infektion in Phagosomen (Abb. 31B). Teilweise konnte auch die Fusion von Lysosomen mit Phagosomen beobachtet werden (Abb. 31C). In späteren Phasen entkamen einige Bakterien ins Zytosol und akkumulierten dort Aktin (Abb. 31D), mit dessen Hilfe sie



sich in den Zellen fortbewegten (Abb. 31E), Protrusions ausbildeten und Nachbarzellen infizierten (Abb. 31F). Ähnliche Experimente mit der Mutante *L. m.*  $\Delta$ hly2 zeigten, daß LLO-defiziente Listerien längere Zeit benötigten, um die Phagosomen zu verlassen (Daten nicht gezeigt). Da sich die Bakterien nur im Zytosol teilen, erklärte das langsamere Entweichen dieser Mutante ins Zytosol die geringere Zahl lebender Bakterien, die nach Lyse infizierter DC im Vergleich zum Wildtyp gefunden worden waren (vgl. Abb. 28). Die elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden von M. Rohde und K. Dittmar, GBF, angefertigt.

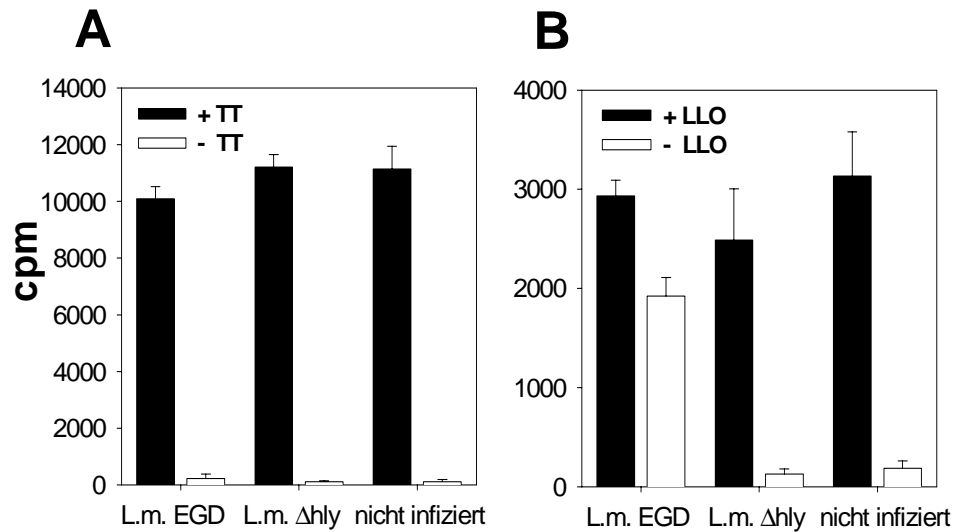


**Abb. 32.** Nach Infektion dendritischer Zellen mit *L. monocytogenes* verlieren diese ihre MHC II-Kompartimente. a) Dendritische Zelle mit MHCII-Kompartimenten (Pfeile). b) und c) vergrößerte Ausschnitte. d) Infizierte dendritische Zelle. Das Bakterium befindet sich noch im Phagosom; im Zytosol sind MHCII-Kompartimente zu erkennen (blaue Pfeile). e) Nach Entweichen der Listerien ins Zytosol - zu erkennen am akkumulierten Aktin (Sternchen) sind keine MHC II-Kompartimente mehr zu finden. G = Golgi-Apparat; M = Mitochondrium; N = Nucleus. Die Aufnahmen wurden von K. Dittmar und M. Rohde angefertigt. Maßstäbe: 0,5µm (a, b, d, e) und 0,1 µm (c).

Bei den hier durchgeführten Infektionsversuchen zeigte sich überraschenderweise ein weiterer Effekt der Infektion mit *L. monocytogenes*. Unreife dendritische Zellen besitzen zwischen Tag 3 und 6 ihrer Entwicklung aus Monozyten in ihrem Zytosol eine große Anzahl multilamellärer Vesikel (Abb. 32 a-c). Bei diesen handelt es sich vermutlich um MHC II-Kompartimente, in denen MHC II-Moleküle mit Peptiden beladen werden (136). Nach Infektion mit *L. monocytogenes* nahm die Zahl dieser Kompartimente drastisch ab, allerdings erst, sobald die Bakterien das Phagosom verlassen hatten (Abb. 32 d, e). Auch nicht infizierte dendritische Zellen verlieren diese Vesikel ab Tag 6 ihrer *in vitro*-Differenzierung wieder. Es stellte sich daher die Frage, ob es sich beim Verlust der MHC II-Kompartimente nach Infektion mit Listerien um eine Art Reifungsprozeß handelte oder ob dieser Effekt zu einer Störung der Antigen-Prozessierung führte.

Außerdem wurde für die effiziente Infektion der DC (d.h. Entweichen in das Zytosol) Listeriolysin benötigt, welches anscheinend, wenn es von lebenden Bakterien produziert wurde, die Phagolysosomen-Membran lysieren konnte. Gleichzeitig hatte aber die Behandlung dendritischer Zellen mit hohen Konzentrationen gereinigten LLOs nicht zu einer Störung der Antigen-Präsentation geführt. Die Produktion von LLO durch lebende Listerien direkt in den Phagosomen, welche mit dem MHC II-abhängigen Antigen-Prozessierungsweg in Verbindung stehen, könnte aber eventuell einen stärkeren Effekt auf die Antigen-Prozessierung ausüben als von außen zugegebenes LLO.

Daher wurden die Auswirkungen der Infektion von dendritischen Zellen mit *L. monocytogenes* auf die Präsentation eines exogen zugegebenen (TT) sowie eines in den Phagosomen produzierten, listeriellen Antigens (LLO) untersucht. Hierfür wurden zusätzlich zu den bisher verwendeten TT-spezifischen T-Zellen zunächst LLO-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen etabliert (Daten nicht gezeigt). Dendritische Zellen wurden mit *L. monocytogenes* oder der Mutante  $\Delta$ hly2 als Kontrolle infiziert. Sie wurden dann entweder zur Stimulation des TT-spezifischen T-Zellklons SZL TT/67 oder des LLO-spezifischen T-Zellklons SZL 5.25 im Proliferationsassay eingesetzt (Abb. 33). Die Infektion mit *L. monocytogenes* EGD beeinträchtigte die Prozessierung des exogenen Antigens TT nicht (Abb. 33A). Auch direkt in den Phagosomen durch *L. monocytogenes* produziertes LLO wurde durch die infizierten dendritischen Zellen prozessiert und präsentiert, da sie LLO-spezifische T-Zellen auch ohne Zugabe extrazellulären, gereinigten LLOs stimulierten (Abb. 33B). Obwohl *L. monocytogenes* humane dendritische Zellen infizieren konnte und mit Hilfe von LLO aus den Phagosomen entkam, war die Antigen-Prozessierung und -Präsentation durch die Infektion nicht gestört. Darüber hinaus hatte anscheinend auch der beobachtete Verlust der multilamellären Vesikel keinen negativen Einfluß auf die T-Zell-Stimulation durch dendritische Zellen.



**Abb. 33.** Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch *Listeria*-infizierte dendritische Zellen. DC wurden wie in Abb. 28 beschrieben infiziert. Nach der Gentamycin-Behandlung wurden die Zellen mit Antigen (0,5 µg/ml) beladen und nach einer Stunde wurden T-Zellen zugegeben. (A) Die Prozessierung exogenen Antigens wurde durch die Infektion nicht gestört. Die Stimulation des TT-spezifischen T-Zellklons SZL TT/67 war nicht beeinträchtigt. (B) Ebenso wurde die Prozessierung eines Antigens, das direkt in den Phagosomen von *L. monocytogenes* produziert wurde (LLO) nicht beeinträchtigt. Der LLO-spezifische T-Zellklon SZL 5.25 wurde von *L. monocytogenes*-infizierten DC auch ohne Zugabe löslichen LLOs stimuliert. Die erfolgreiche Infektion der DC wurde kontrolliert, indem ein Teil der Zellen lysiert und die colony-forming units bestimmt wurden. Sie lagen bei  $3,3 \times 10^6$ /ml für *L. m.* EGD und  $1,2 \times 10^3$ /ml für *L.m.* Δhly.

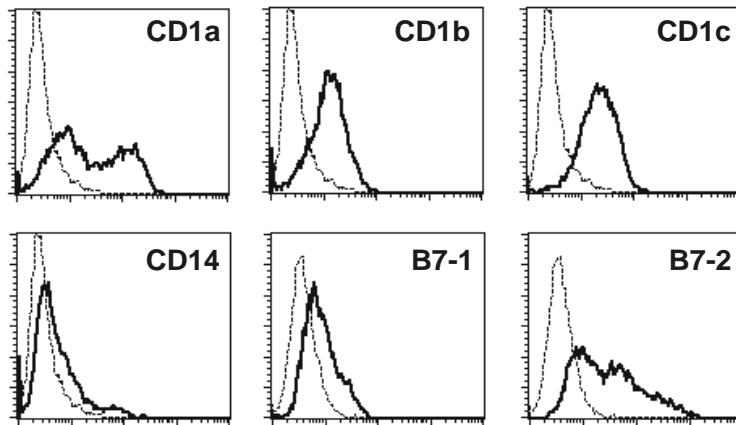
Zusammengefaßt zeigten die Experimente zu den durch *L. monocytogenes* vermittelten Effekte auf die Antigen-Präsentation, daß PBMC und Monozyten nach Behandlung mit sublytischen Mengen von LLO nicht mehr in der Lage waren, T-Zellen normal zu stimulieren. Dieser Effekt konnte durch hohe Antigen-Mengen ausgeglichen werden. Es fanden sich weder Hinweise auf eine spezifische Modifizierung der Antigen-Prozessierung noch auf eine Veränderung der Expression kostimulatorischer Moleküle. Vielmehr beeinträchtigte LLO insgesamt die Antigen-Präsentation sensibler APC. Im Gegensatz zu diesen zeigten dendritische Zellen sowie EBV-transformiert B-Zellen eine hohe Resistenz gegenüber LLO. Die Behandlung dieser APC mit sublytischen Mengen von Listeriolysin führte nicht zu einer Störung der T-Zell-Stimulation. Folglich war die Antigen-Prozessierung und -Präsentation dieser Zellen nicht gestört. Trotz der hohen Resistenz dendritischer Zellen gegen LLO konnten diese durch *L. monocytogenes* infiziert werden, wobei die Expression von LLO für das effiziente Verlassen der Phagosomen essentiell war. Gleichzeitig führte die Infektion dendritischer Zellen dazu, daß deren multilamelläre Vesikel, bei denen es sich vermutlich um MHC II-Kompartimente handelt, verloren gingen. Jedoch hatten weder die Produktion von Listeriolysin durch lebende Listerien in den Phagosomen noch das im Verlauf des Infektionszyklus beobachtete Verschwinden der multilamellären Vesikel eine Beeinträchtigung der T-Zell-Stimulation zur Folge. Sowohl exogen zugegebenes Tetanus-Toxoid als auch in den Phagosomen produziert LLO konnten spezifischen T-Zellen präsentiert werden.

### 3.6 Stimulation CD1-restringierter CD4/CD8 doppelt-negativer (DN) T-Zellen durch *Listeria monocytogenes*

Die essentielle Rolle klassischer T-Zellen bei der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* war, zumindest bei sekundären Infektionen, im Mausmodell bereits gut belegt. Darüber hinaus schienen bestimmte nicht-klassische T-Zellen, welche durch nicht-klassische MHC I-Moleküle wie H2-M3 oder Qa-1 restringiert sind, ebenfalls Effektorfunktionen bei der Lyse infizierter Wirtszellen auszuüben (201, 257). Ob CD1-restringierte T-Zellen bei listeriellen Infektionen eine Rolle spielen, war bislang jedoch ungeklärt (vgl. Kap. 1.2.2.2). Experimente mit MHC II-defizienten Mäusen, denen klassische T-Helferzellen fehlen, wiesen darauf hin, daß evtl. CD1d-restringierte NK T-Zellen bei Infektionen mit einem anderen intrazellulären Pathogen, *Toxoplasma gondii*, Helfer-Funktionen ausüben könnten (89).

Im Humansystem waren CD1-restringierte, CD4/CD8-doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen) beschrieben worden, welche Zellwand-Bestandteile aus *Mycobacterium tuberculosis* erkannten und lytische Effektorfunktionen besaßen. Es ist jedoch unklar, ob die Rolle dieser Zellen *in vivo* in der Lyse infizierter Zellen besteht oder ob sie eher Helfer-Funktion besitzen. Da in der Maus nur CD1d, der Ligand für NK T-Zellen, nicht aber CD1a-c exprimiert wird, fehlt bisher ein Tiermodell, in dem die *in vivo*-Funktion dieser Zellen untersucht werden könnte. Es ist aber vorstellbar, daß DN T-Zellen aufgrund des fehlenden Polymorphismus der CD1-Moleküle und der konservierten Struktur der durch diese Moleküle gebundenen und durch DN T-Zellen erkannten bakteriellen Zellwand-Bestandteile generell eine Rolle bei der Abwehr vieler verschiedener gram-positiver Pathogene ausüben. Daher wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht, ob aus gesunden Spendern CD1-restringierte DN T-Zellen mit Spezifität für listerielle Antigene isoliert werden konnten und welche Effektorfunktionen diese Zellen besaßen.

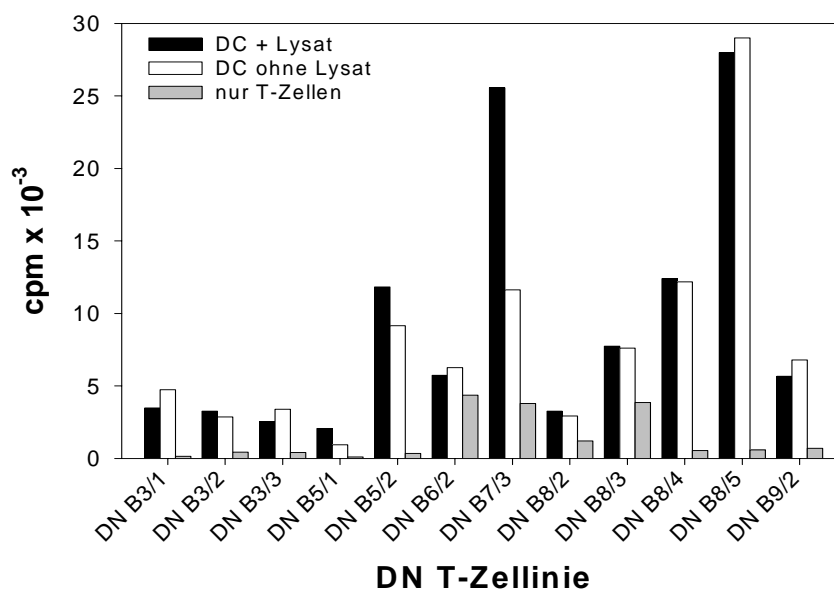
Nur ein kleiner Teil (ca. 1 %) der im Blut zirkulierenden T-Zellen besitzt den CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Phänotyp. Daher wurden DN T-Zellen zunächst in mehreren Schritten durch negative Selektion angereichert. Monozyten wurden durch ihre Adhärenz an Plastikoberflächen und B-Zellen durch Adhärenz an Nylon-Wolle abgetrennt. CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper und nachfolgender Komplement-Lyse und magnetischer Sortierung entfernt. Die resultierende Zellpopulation enthielt ca. 90 % CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> Zellen (nicht gezeigt). Darüber hinaus waren stets geringe Mengen kontaminierender CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden. Anschließend wurden die T-Zellen mehrfach mit CD1-positiven dendritischen Zellen (Abb. 34) und *L. monocytogenes*-Lysat stimuliert. Dabei wurden für die erste Stimulation autologe, für alle nachfolgenden Restimulationen heterologe DC verwendet. Durch den Gebrauch dendritischer Zellen aus wechselnden Spendern wurde sichergestellt,



**Abb. 34.** Phänotyp der benutzten dendritischen Zellen. Die Zellen waren CD1a-c-positiv, CD14-negativ, exprimierten wenig B7-1 und hohe Mengen B7-2. Der Phänotyp variierte leicht zwischen verschiedenen DC-Präparationen. Gestrichelte Linien: Negativ-Kontrolle.

daß nur CD1-restringierte Zellen kontinuierlich stimuliert wurden, während kontaminierende CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausselektiert werden sollten. Die etablierten Zelllinien wurden regelmäßig im Durchflußzytometer überprüft und enthielten nach drei bis vier Re-stimulationen mehr als 98% CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

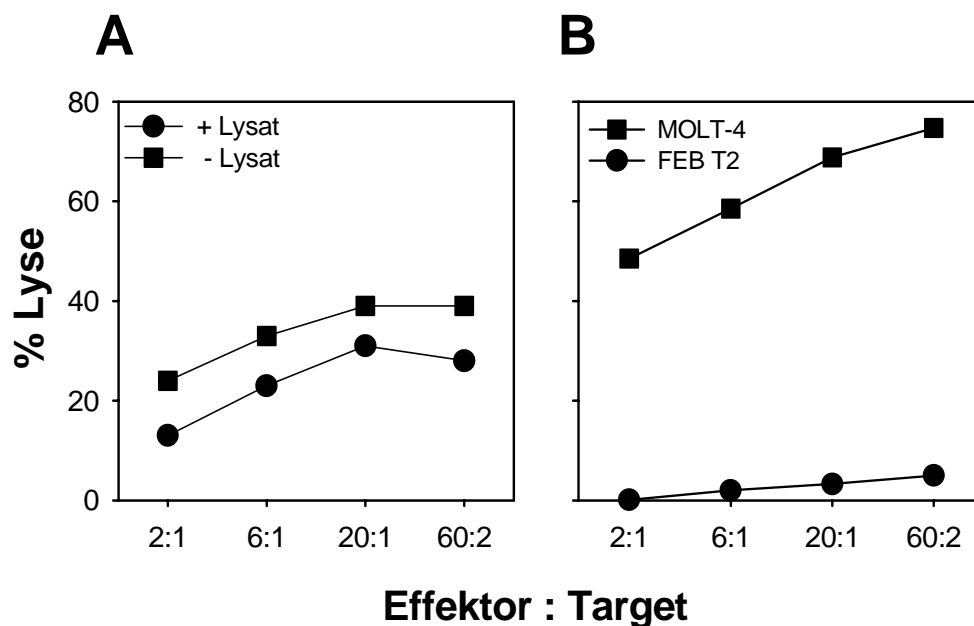
Die so etablierten DN T-Zelllinien wurden zunächst auf ihre Spezifität für Antigene aus *L. monocytogenes* getestet. Dazu wurden sie mit bestrahlten CD1-positiven dendritischen Zellen allein oder mit *L. m.*-Lysat stimuliert und die Proliferation nach fünf Tagen gemessen. Abb. 35 zeigt die Ergebnisse für einige der etablierten Linien. Es stellte sich heraus, daß die meisten Linien zwar zur Stimulation dendritische Zellen benötigten, die Anwesenheit von Lysat die Proliferation aber nicht verstärkte. Eine Linie proliferierte mit Lysat etwas stärker (Faktor 2; Linie DN B7/3). Der Test wurde mehrfach wiederholt, wobei einzelne Linien teilweise unterschiedlich reagierten. Linie DN B7/3 zeigte in drei unabhängigen Proliferationstests eine stärkere Proliferation in der Anwesenheit von Lysat.



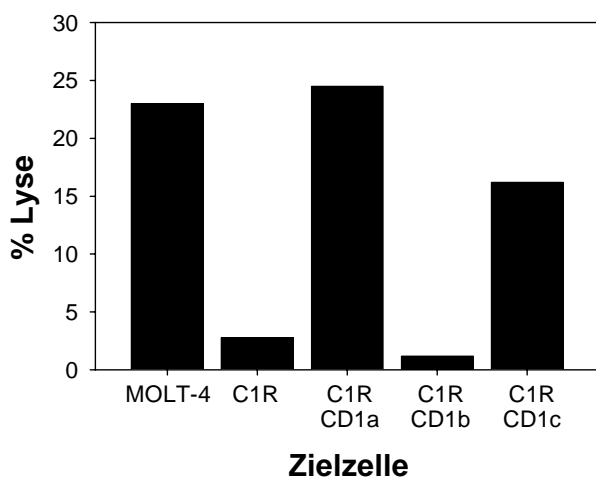
**Abb. 35.** Spezifität der etablierten DN T-Zell-Linien. Gezeigt sind einige der etablierten Linien. Sie wurden mehrfach getestet. DN-T-Zellen wurden mit bestrahlten heterologen dendritischen Zellen mit oder ohne *L. monocytogenes*-Lysat (1:100) inkubiert und die T-Zell-Proliferation durch Messung des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt. Die meisten Linien waren autoreaktiv. Linie DN B7/3 zeigte eine deutlich stärkere Proliferation in Gegenwart von Lysat.



Zur Charakterisierung der Effektorfunktionen der isolierten DN T-Zelllinien wurde untersucht, ob diese Zellen CD1-positive Zielzellen lysierten. Zunächst wurden dendritische Zellen, unbeladen oder beladen mit Lysat aus *L. monocytogenes*, als Zielzellen im  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätstest eingesetzt. Als Effektorzellen diente die Linie DN B7/3, die zuvor eine teilweise Antigen-abhängige Proliferation gezeigt hatte. Diese Linie lysierte allerdings dendritische Zellen unabhängig davon, ob diese mit Lysat beladen waren oder nicht (Abb. 36A). Um zu klären, ob CD1-Moleküle tatsächlich als Restriktionselement für diese Zellen dienten, wurden daraufhin EBV-transformierte B-Zellen (Klon FEB T2) oder MOLT-4-Zellen als Zielzellen eingesetzt. MOLT-4 exprimiert CD1a, b und c, während EBV-B-Zellen CD1-negativ sind (die Expression von CD1 war zuvor zytofluorometrisch überprüft worden; Daten nicht gezeigt). Die Zellyse wurde mit unbeladenen Zielzellen durchgeführt, da die Anwesenheit von Lysat zuvor keinen Einfluß gehabt hatte. DN T-Zellen (Linie DN B7/3) lysierten CD1-positive MOLT-4, nicht aber die EBV-B-Zellen (Abb. 36B).



**Abb. 36.** Lyse CD1-positiver Zielzellen durch DN T-Zellen. (A) Mit *L. monocytogenes*-Lysat beladene oder unbeladene dendritische Zellen wurden von der Linie DN B7/3 lysiert. (B) In Abwesenheit von Lysat wurden CD1-positive MOLT-4, jedoch nicht die CD1-negative EBV-transformierte B-Zelllinie FEB T2 durch DN B7/3 lysiert. Die Messung der Zellyse erfolgte im  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitätstest (2.12.2).



**Abb. 37.** Bestimmung der Restriktion der DN T-Zelllinie DN B3/1. MOLT-4 (Positiv-Kontrolle) oder C1R (transfiziert mit CD1a, b, c oder leerem Vektor) wurden als Zielzellen im JAM-Test eingesetzt. DN T-Zellen wurden als Effektorzellen im Verhältnis 20:1 eingesetzt und die Lyse der Zielzellen bestimmt. Die hier gezeigte Linie DN B3/1 enthielt sowohl CD1a- als auch CD1c-restringierte Zellen.

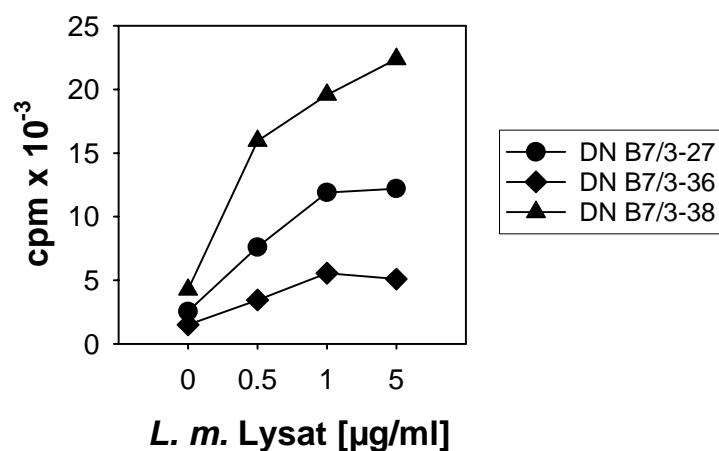
Daraufhin wurde die genaue Restriktion der isolierten DN T-Zelllinien ermittelt. Dazu wurden C1R-Zellen benutzt, die mit CD1a, b, c oder leerem Vektor transfiziert worden waren (die Zellen wurden von Dr. Paolo Dellabona, DIBIT, Mailand, bereitgestellt). Die Zellen wurden als Zielzellen im JAM-Test (Kap. 2.12.2.1) eingesetzt und die Zellyse durch die verschiedenen DN T-Zelllinien gemessen. Abb. 37 zeigt als Beispiel die Ergebnisse für Linie DN B3/1, welche sowohl CD1a- als auch CD1c-transfizierte Zellen lysierte. Folglich enthielt diese Linie vermutlich mindestens zwei Klone mit unterschiedlicher Restriktion.

Die Ergebnisse der Analyse mehrerer DN T-Zelllinien sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß alle drei auf humanen dendritischen Zellen exprimierten CD1-Moleküle als Restriktionselement dienen konnten. Linien, die verschiedene CD1-Moleküle erkannten, enthielten vermutlich mehrere Klone mit unterschiedlicher Restriktion.

**Tab. 4.** Restriktion einiger der isolierten DN T-Zelllinien. Die Restriktion wurde mit Hilfe CD1a, b oder c-transfizierter Zielzellen (C1R) im JAM-Test (2.12.2.1) bestimmt. Die Zielzellen wurden nicht mit Lysat beladen.

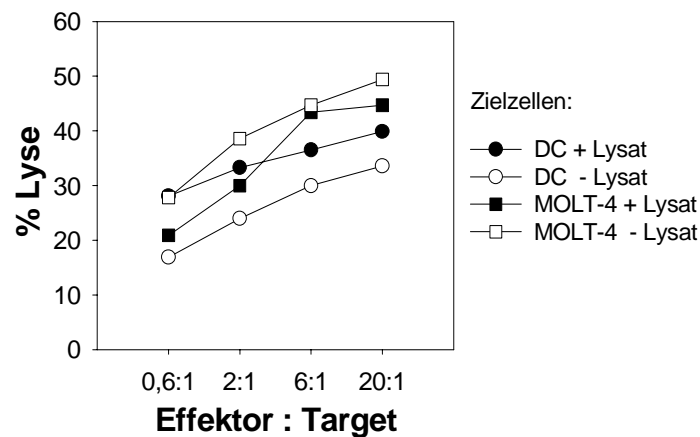
T-Zelllinie	Restriktionselement
DN B3/1	CD1a + CD1c
DN B3/2	CD1a + CD1c
DN B5/1	CD1b
DN B5/2	CD1b
DN B8/1	CD1a
DN B8/2	CD1b
DN B8/3	CD1c
DN B8/4	CD1c
DN B15/6	CD1b + CD1c

Die meisten der isolierten DN T-Zelllinien hatten eine autoreaktive Proliferation gezeigt, d.h. sie wurden von unbeladenen wie *L. m.*-Lysat-beladenen dendritischen Zellen gleich stark stimuliert. Eine Linie (DN B7/3) hingegen proliferierte stärker in Gegenwart von Lysat (vgl. Abb. 35). Für die Lyse von Zielzellen durch diese Linie war hingegen nur die Expression von CD1 erforderlich (vgl. Abb. 36). Es war möglich, daß diese Linie gleichzeitig autoreaktive und *L. m.*-spezifische Klone enthielt. Andererseits wäre denkbar, daß für die Aktivierung der lytischen Funktion die Erkennung "leerer" CD1-Moleküle ausreichte, während für die Proliferation ein stärkeres Signal, evtl. vermittelt durch beladene CD1-Moleküle, benötigt wurde.



**Abb. 38.** Antigen-abhängige Proliferation einiger isolierter DN T-Zellklone. Die T-Zellen wurden mit bestrahlten dendritischen Zellen und unterschiedlichen Mengen *L. m.* Lysat stimuliert. Anschließend wurde der Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin gemessen.

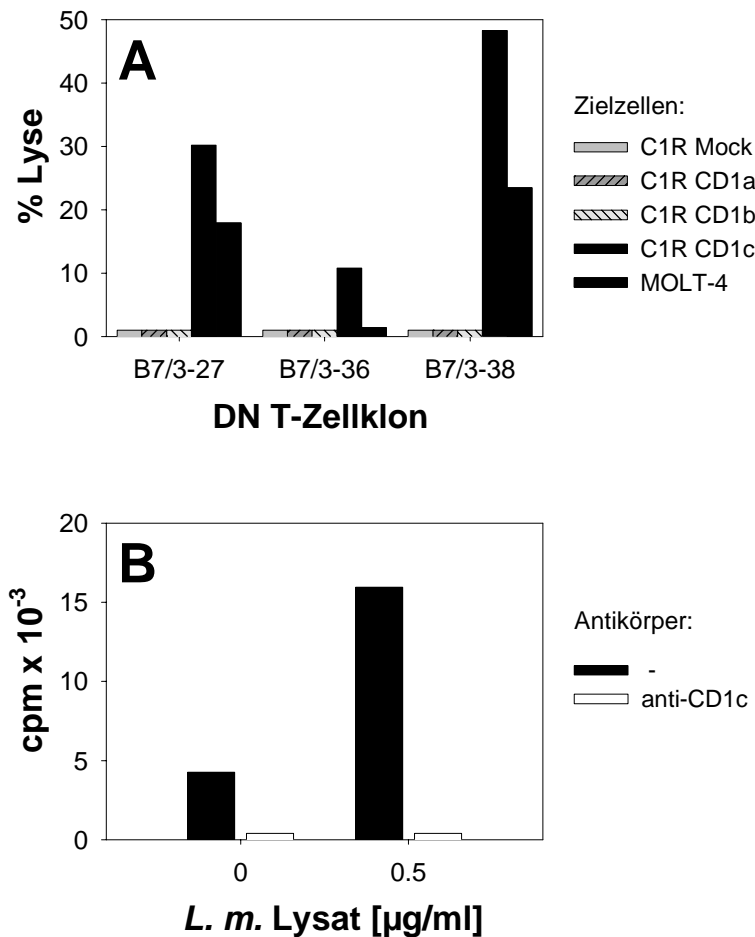
Daher wurden aus dieser Zelllinie zunächst Klone isoliert, um festzustellen, ob sich autoreaktive von spezifischen Zellen trennen ließen. Die Überprüfung der isolierten Klone im Proliferationstest zeigte, daß alle mehr oder weniger stark Antigen-abhängig proliferierten (Abb. 38; drei ausgewählte Klone sind gezeigt), aber auch durch unbeladene dendritische Zellen in gewissem Maß stimuliert wurden. Bei der Lyse CD1-positiver Zielzellen hingegen spielte die Beladung mit Antigen, wie schon bei den DN T-Zelllinien beobachtet, keine Rolle. Dendritische Zellen oder MOLT-4 wurden unabhängig davon lysiert, ob sie mit Lysat aus *L. monocytogenes* beladen waren oder nicht (Abb. 39). Für die Aktivierung zur Zellyse schien also die Erkennung "leerer" CD1-Moleküle auszureichen, während die Proliferation durch die Anwesenheit von Antigen verstärkt wurde. Dabei ist zu beachten, daß CD1-Moleküle in Abwesenheit fremden Antigens möglicherweise mit zelleigenen lipidartigen Verbindungen beladen sind. Dies war zumindest für CD1d gezeigt worden (82).



**Abb. 39.** Die An- oder Abwesenheit von Antigen hat auf die Lyse CD1-positiver Zellen durch DN B7/3-38 keinen nennenswerten Einfluß. Dendritische Zellen oder MOLT-4 wurden als Zielzellen im Zytotoxizitätstest eingesetzt und mit DN B7/3-38 als Effektorzellen kokultiviert.

Die lytische Funktion der isolierten DN T-Zellklone wurde durch die Erkennung von CD1c ausgelöst. Die erkannte Isoform von CD1 wurde, wie zuvor bei den DN T-Zelllinien, mit Hilfe CD1a, b oder c-transfizierter C1R-Zellen bestimmt (Abb. 40A). Da die Klone zwar Antigen-abhängig proliferierten, aber Antigen-unabhängig CD1-positive Zielzellen lysierten, bestand die Möglichkeit, daß die Proliferation nicht CD1-abhängig war. Daher wurde untersucht, ob durch Zugabe CD1c-spezifischer Antikörper die Proliferation inhibiert werden konnte. Der Klon DN B7/3-38 wurde mit dendritischen Zellen in An- oder Abwesenheit von Lysat und anti-CD1c stimuliert. Es zeigte sich, daß die Blockierung von CD1c durch den Antikörper die Proliferation vollständig hemmte. Dabei wurde auch die Hintergrundproliferation ohne Antigen komplett inhibiert (Abb. 40B). Die Zugabe von anti-CD1a oder anti-CD1b hatte keinen Einfluß auf die Proliferation (Daten nicht gezeigt). Daher war die Proliferation wie auch die lytische Aktivität der isolierten Klone CD1c-restringiert.

Zusammengefaßt zeigten diese Ergebnisse, daß die meisten isolierten DN T-Zellen autoreaktiv waren, also ohne zusätzliches Antigen durch CD1-positive dendritische Zellen stimuliert wurden. Die DN T-Zelllinien besaßen lytische Aktivität, die durch die Erkennung von CD1 ohne Zugabe fremden Antigens ausgelöst wurde. Einige isolierte DN T-Zellklone proliferierten Antigen-abhängig, aber lysierten, wie die Linien, CD1-positive Zielzellen Antigen-unabhängig. Zur Induktion der Proliferation war die Erkennung von CD1 nötig, da sie durch Zugabe spezifischer Antikörper inhibiert werden konnte. Die Diskrepanz zwischen Antigen-abhängiger Proliferation und Antigen-unabhängiger Zellyse könnte mit der Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle nach Inkubation dendritischer Zellen mit Lysat aus *L. monocytogenes* erklärt werden. Einen solchen Effekt hat z. B. die Inkubation dendritischer Zellen mit LPS (6). Entsprechende Experimente konnten im Zeitrahmen dieser Arbeit leider nicht mehr abgeschlossen werden.



**Abb. 40.** Sowohl lytische Funktion als auch Proliferation der isolierten DN T-Zellklone waren CD1c-restringiert. (A) Bestimmung des Restriktionselements für die Zellyse. CD1a-c-positive MOLT-4 Zellen oder C1R-Zellen, die mit CD1a, b, c oder leerem Vektor (Mock) transfiziert worden waren, wurden als Zielzellen im <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die Zellyse fand in Abwesenheit von *L. m. Lysat* statt. Das Verhältnis der Effektor- zu Zielzellen betrug 20:1. (B) Der Klon DN B7/3-38 proliferierte CD1c-restringiert und Antigen-abhängig. Die Zellen wurden mit bestrahlten DC mit oder ohne *L. m. Lysat* stimuliert. Die Zugabe von 2 µg/ml anti-CD1c hemmte die Proliferation, während anti-CD1a oder -b keinen Effekt hatten (nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Die spezifische humorale Immunantwort

Die Bedeutung angeborener sowie spezifischer zellulärer Mechanismen bei der Abwehr von *L. monocytogenes*-Infektionen ist im Mausmodell seit längerem belegt (vgl. Kap. 1.4.2). Hingegen schien die spezifische humorale Immunantwort keine Rolle zu spielen, da in diesem Tiermodell durch Transfer von Immunseren keine Resistenz gegen Listeriose induziert werden konnte (218, 258). Sein intrazellulärer Infektionszyklus scheint diesen Erreger vor der Wirkung von Antikörpern zu schützen. Dennoch war die Bildung spezifischer Antikörper gegen Listeriolysin O und p60 in Listeriose-Patienten mehrfach beschrieben worden (227-231). Außerdem wurde gezeigt, daß *L. monocytogenes* im Darm gesunder Personen vorkommen kann (259, 260), ohne daß dies zum Ausbruch der Listeriose führt. Möglicherweise spielen neutralisierende Antikörper eine Rolle in besiedelten, aber gesunden Personen, indem sie den Eintritt der Listerien in den Infektionszyklus verhindern. Über die spezifische humorale Immunantwort gesunder Individuen, die trotz Kontakt mit Listerien nicht erkrankt waren, war jedoch nichts bekannt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde erstmals detailliert untersucht, welche Proteine aus *L. monocytogenes* als Antigene für die spezifische humorale Immunantwort im Menschen dienen können. Dazu wurden zunächst Seren gesunder Spender herangezogen, bei denen ein früherer Kontakt mit Listerien vermutet wurde. Nur zwei sekretierte Proteine induzierten eine starke IgG-Antwort in den meisten der gesunden Spender. Sie konnten als LLO und IrpA identifiziert werden, indem Proteinextrakte aus entsprechenden Mutanten von *L. monocytogenes* oder die gereinigten Proteine als Antigen im Immunoblot eingesetzt wurden. Interessanterweise wurden nicht immer beide Proteine erkannt. Einige Seren enthielten nur Antikörper gegen LLO oder IrpA. InlB und ActA wurden im Immunoblot nur durch das Serum eines Spenders erkannt. Da in den Seren von 20 zufällig ausgewählten Spendern im Immunoblot keine Antikörper gegen listerielle Proteine gefunden wurden (Daten nicht gezeigt) kann ausgeschlossen werden, daß die beschriebenen Reaktionen durch kreuzreagierende Antikörper verursacht wurden, die eigentlich durch Proteine anderer Bakterien-Gattungen induziert worden waren. Mittels ELISA konnten auch keine IgA-Antikörper gegen diese Antigene im Serum gesunder Spender nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), weshalb eine chronische Kolonisierung dieser Personen mit *L. monocytogenes* ausgeschlossen werden kann. Mit den Seren gesunder Spender wurden darüberhinaus eine Reihe von Proteinen in Protein-Extrakten des apathogenen Stammes *L. innocua* detektiert, die allerdings nicht näher charakterisiert wurden.

Wurden gereinigte Proteine aus *L. monocytogenes* als natives Antigen im ELISA eingesetzt, ergab sich ein ähnliches Bild wie im Immunoblot für LLO, IrpA und InlB. Allerdings wurden hier in mehreren gesunden Spendern auch niedrige Antikörper-Titer gegen p60 und ActA nachgewiesen, welche zuvor im Immunoblot nicht detektiert werden konnten.

Im Gegensatz zu den Seren gesunder Spender enthielten die Seren von Listeriose-Patienten IgG-Antikörper gegen ein breiteres Spektrum listerieller Proteine. So wurden im ELISA mit solchen Seren auch IgG-Titer gegen InlB, ActA und p60 gefunden, die mit den IgG-Titern gegen LLO und IrpA vergleichbar waren. Die IrpA-spezifischen Antikörper in Patienten erkannten im Immunoblot im Gegensatz zu den Seren gesunder Spender in sieben von acht getesteten Seren ein 32 kD-Protein, bei dem es sich um eine unprozessierte Form von IrpA handeln könnte, während das 30 kD-IrpA nur von vier Patienten erkannt wurde, und zwar schwächer als das 32 kD-Protein.

Bereits in früheren Arbeiten war die Bildung spezifischer Antikörper gegen einzelne Proteine aus *L. monocytogenes* mit dem Ziel der Entwicklung eines einfachen Nachweises listerieller Infektionen untersucht worden. Solche Arbeiten konzentrierten sich meist auf LLO-spezifische Antikörper. Darüberhinaus war die Bildung hoher Mengen p60-spezifischer Antikörper in Listeriose-Patienten beschrieben worden (229). Der Nutzen eines solchen Nachweises für die Diagnose einer primären Infektion ist aufgrund der zeitlichen Verzögerung der Antikörper-Produktion und dem rapiden Verlauf der Listeriose zweifelhaft. Die Diagnose einer weiter zurückliegenden Listeriose oder eines Kontaktes mit Listerien könnte aber z.B. bei Schwangeren von Nutzen sein, um das Risiko eines Ausbruchs und damit einer Schädigung des Fötus abzuschätzen. Außerdem liegen keine Daten über die Inzidenz listerieller Infektionen in der Bevölkerung vor, da solche Infektionen im gesunden Menschen meist unbemerkt verlaufen und daher nur die gelegentlich auftretenden Epidemie-artigen Ausbrüche dokumentiert sind. Solche Informationen wären aber sinnvoll, um das tatsächliche Gefährdungspotential dieses Erregers einschätzen zu können.

Die hier durchgeführte Analyse der Antikörper-Antwort in gesunden Spendern zeigt, daß ein vorhergehender Kontakt mit Listerien auch in Personen, bei denen keine Listeriose-Erkrankung bekannt war, durch die Analyse spezifischer Antikörper gegen LLO und/oder IrpA nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus kann durch Einsatz weiterer gereinigter Proteine (InlB, ActA, p60) auch unterschieden werden, ob ein Spender nur mit Listerien in Kontakt gekommen ist, oder ob sich eine Infektion manifestiert hat, da in Listeriose-Patienten Antikörper gegen ein breiteres Spektrum listerieller Antigene gefunden wurde. Bei einem der getesteten gesunden Spender (Spender A) glich das Spektrum der durch IgG-Antikörper erkannten listeriellen Proteine denen der Listeriose-Patienten. In der Tat besaß dieser Spender darüberhinaus eine hohe Frequenz spezifischer T-Zellen, welche LLO, IrpA und InlB erkannten. In

anderen gesunden Spendern wurden hingegen trotz des Vorhandenseins spezifischer Antikörper nur niedrige Frequenzen oder gar keine spezifischen T-Zellen gefunden. Leider konnten diese Ergebnisse nicht mit Listeriose-Patienten verglichen werden, da von diesen nur Seren zur Verfügung standen.

Die Notwendigkeit, beim Testen von Seren auf die Anwesenheit Listerien-spezifischer Antikörper ein relativ breites Spektrum gereinigter Proteine als Antigen einzusetzen, wurde dadurch belegt, daß einige der gesunden Spender LLO oder IrpA, nicht aber beide Proteine erkannten. Außerdem besitzt z.B. die tierpathogene Art *L. ivanovii* das dem LLO homologe Ivanolysin. Tatsächlich erkannten im Immunoblot mit Protein-Extrakten dieses Stammes einige Seren sowohl gesunder Spender als auch Listeriose-Patienten ein Protein, bei dem es sich der Größe nach um Ivanolysin handeln könnte (Daten nicht gezeigt). Der Nutzen von p60 als Test-Antigen ist nur eingeschränkt. Zumindest im Immunoblot wurde es entgegen früheren Berichten (229) nur von einigen Seren, und dann sehr schwach, angefärbt. Im ELISA konnten zwar p60-spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden, allerdings besitzen alle *Listeria*-Spezies, auch die apathogenen, mit p60 aus *L. monocytogenes* verwandte Proteine (160).

Es ist unklar, warum in den meisten gesunden Spendern hauptsächlich Antikörper gegen LLO und/oder IrpA gebildet werden. Beide Proteine werden durch *L. monocytogenes* sekretiert und könnten daher während der kurzen extrazellulären Phase zur Stimulation von B-Zellen zur Verfügung stehen. Allerdings gilt dasselbe für p60, für das nur im ELISA niedrige IgG-Titer detektiert wurden. Alle drei Proteine können im Mausmodell als protektive T-Zell-Antigene dienen, während nicht-sekretierte Proteine keinen Schutz vermitteln, obwohl spezifische T-Zellen gebildet werden können. Bei den gesunden Spendern war unbekannt, ob tatsächlich eine Listerien-Infektion stattgefunden hatte. Jedoch ließ die Tatsache, daß in 20 Kontrollseren keinerlei *L. monocytogenes*-spezifische Antikörper gefunden wurden, diese Vermutung zu. Da in fünf von acht Listeriose-Patienten im ELISA Antikörper gegen alle getesteten Proteine nachgewiesen werden konnten, scheinen im Verlauf einer Listeriose auch nicht-sekretierte Proteine als Ziele der spezifischen humoralen Immunantwort zu dienen.

Es stellt sich die Frage, welche Funktion die in gesunden Spendern gefundenen LLO- und IrpA-spezifischen Antikörper ausüben könnten. Im Mausmodell wurde keine protektive Funktion für Listerien-spezifische Antikörper gefunden. Es wurden sogar negative Effekte spezifischer Antikörper beschrieben. So wurde berichtet, daß die Aufnahme von Listerien durch Makrophagen über den C3-Rezeptor zu deren Abtötung führt (233), während diese bei Aufnahme über Fc-Rezeptoren unterbleibt (232). Die Anwesenheit von Immunkomplexen kann außerdem die IL-10-Ausschüttung durch Makrophagen verstärken, was unter experimentellen Bedingungen zum Tod infizierter Mäuse führte (182). Die Präsenz spezifischer Antikörper in gesunden Spendern, die mit Listerien in Kontakt gekommen waren und, wie aus der erhöhten Frequenz spezifischer T-Zellen ersichtlich, zumindest teilweise eine Infektion



durchgemacht hatten, argumentiert eher gegen einen solchen schädlichen Effekt. Auch spiegeln die experimentellen Bedingungen im Tiermodell (intravenöse oder intraperitoneale Infektion) nicht die Bedingungen einer normalen Infektion über das Darmepithel wider. Hier könnten spezifische IgA-Antikörper, welche in das Darmlumen sekretiert werden, eine Schutzfunktion ausüben. Solche Antikörper wurden zwar in den Seren der hier untersuchten gesunden Spender nicht gefunden, jedoch könnte dies daran liegen, daß IgA-produzierende Plasmazellen hauptsächlich in Epithelien lokalisiert sind.

Im Verlauf der Charakterisierung der Antikörper-Antwort gegen Listerien wurde auch p60 gereinigt, welches in *in vitro*-Experimenten eine Rolle bei der Infektion von Wirtszellen zu spielen scheint (156-158). Das gereinigte p60 war über ein pH-Spektrum von pH5 bis pH8 aktiv, wie durch die Lyse von *Micrococcus lysodeikticus* gezeigt werden konnte. Noch nicht abgeschlossene Untersuchungen an kultivierten Darmepithelzellen zeigten, daß p60 die Stimulation von CFTR-Kanälen durch LLO erleichtern kann (Fromm, Gitter und Jacobs; persönliche Mitteilung). Der Mechanismus ist allerdings ungeklärt. Eine mögliche Erklärung wäre, daß p60 die Mucin-Schicht von Epithelzellen angreifen könnte. Eventuell erleichtert auch die starke positive Ladung dieses Proteins (pI ca. 11) den Zugang der Listerien zur negativ geladenen Zelloberfläche

## 4.2 Inhibition der MHCII-abhängigen T-Zell-Stimulierung

*Listeria monocytogenes* hat, wie viele andere Pathogene auch, Mechanismen entwickelt, die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen, um sich so Vorteile in der Pathogenese zu verschaffen. Das von den Listerien exprimierte LLO, das zum Verlassen des Phagosoms nach Aufnahme durch Makrophagen benötigt wird, inhibiert im Maussystem die MHCII-abhängige T-Zell-Stimulation. Dieser Effekt war schon relativ früh beschrieben worden und man ging anfangs davon aus, daß die verminderte T-Zell-Stimulation durch *L. monocytogenes*-infizierte Makrophagen auf eine Störung der Antigen-Prozessierung zurückzuführen sei (222, 223). Auch eine Herunterregulierung von MHCI und MHCII auf infizierten Makrophagen wurde beschrieben, allerdings war in diesen Experimenten nicht klar, ob hierfür LLO verantwortlich war (261). Spätere Experimente zeigten jedoch, daß LLO die Prozessierung von Proteinen nicht einfach inhibierte, sondern in einer Weise modulierte, die schließlich zur Anergisierung spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte (vgl. Kap. 1.4.3).

Dieser Effekt war auch interessant im Hinblick auf Versuche verschiedener Gruppen, *L. monocytogenes* als Carrier für heterologe Proteine zu benutzen und als Lebendimpfstoff einzusetzen. Solche bakteriellen Lebendimpfstoffe besitzen gegenüber herkömmlichen Vakzinierungsmethoden mit gereinigten Proteinen den Vorteil, daß sie einfach und billig herzustellen sind und zudem als lebendes Adjuvans

fungieren. Listerien infizieren unter anderem professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen und wären daher ideale Carrier für die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen heterologe Antigene. Sie wurden auch bereits erfolgreich zur Induktion zytotoxischer T-Zellen gegen Viren und Tumore eingesetzt (200, 234-238). Da Listerien während ihres Infektionszyklus das Phagosom und damit den Prozessierungsweg für MHCII-abhängige Antigene passieren, könnten sie auch als Carrier für die gleichzeitige Induktion spezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt werden. Hier könnten allerdings die von LLO vermittelten immunomodulatorischen Effekte bei der Induktion spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen problematisch sein. Zudem induzierte LLO im Mausmodell Apoptose wichtiger professioneller APC, den dendritischen Zellen (175).

Daher wurde untersucht, ob der im Maussystem beschriebene inhibitorische Effekt von LLO, also die gezielte Inaktivierung spezifischer T-Zellen, auch im Human-System auftritt. Dazu wurden zunächst PBMC *in vitro* mit LLO inkubiert und die Auswirkung dieser Behandlung auf die Stimulation TT-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit nativem Antigen (Tetanus-Toxoid) untersucht. LLO-behandelte PBMC waren nicht in der Lage, T-Zellen normal zu stimulieren. Dieser Effekt konnte durch hohe Antigen-Dosen wieder ausgeglichen werden. Um die maximale T-Zell-Stimulation zu erreichen, mußte die TT-Konzentration allerdings ca. 670-fach erhöht werden.

PBMC enthalten verschiedene Typen Antigen-präsentierender Zellen, wie B-Zellen und Monozyten, aber z.B. keine oder nur wenige dendritische Zellen. Deshalb wurde der Einfluß von LLO auf die Antigen-Präsentation an gereinigten APC-Typen (B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen) untersucht. Zusätzlich zu diesen unspezifischen APC wurden außerdem TT-spezifische EBV-B-Zellen generiert und im Inhibitionsassay eingesetzt, da möglicherweise die Art der Aufnahme des Antigens (unspezifisch oder über den B-Zell-Rezeptor) einen Einfluß auf die Inhibition haben konnte. Es stellte sich heraus, daß LLO nicht auf alle humanen APC gleich wirkt. B-Zellen reagierten sehr empfindlich auf geringe Konzentrationen LLO. Vermutlich wurden sie irreversibel geschädigt, da auch mit hohen Antigen-Dosen die T-Zell-Proliferation nicht wiederhergestellt werden konnte. Monozyten waren nach Behandlung mit ca. 1 oder 10 µg/ml LLO nicht mehr in der Lage, die T-Zell-Proliferation normal zu induzieren. Diese konnte jedoch durch erhöhte Antigen-Dosen rekonstituiert werden. Dendritische Zellen hingegen stimulierten die T-Zellen auch nach Behandlung mit bis zu 20 µg/ml LLO in normaler Weise. Dies war bemerkenswert, da diese Zellen durch *in vitro*-Differenzierung aus Monozyten erhalten wurden und sich die LLO-Resistenz daher innerhalb weniger Tage ausbildete. TT-spezifische, EBV-transformierte B-Zellen zeigten ebenfalls eine hohe Resistenz gegenüber der LLO-Behandlung. Sie inhibierten die T-Zell-Proliferation erst nach Behandlung mit LLO-Konzentrationen über 10 µg/ml. Selbst nach Behandlung mit 50 µg/ml, bei der alle übrigen Zelltypen irreversibel geschädigt wurden, konnte die T-Zell-Stimulation durch Gabe hoher Antigen-Dosen wiederhergestellt werden.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener APC gegen die Behandlung mit LLO stellte einen auffallenden Unterschied zum Maussystem dar. Experimente in diesem System hatten gezeigt, daß alle getesteten Typen Antigen-präsentierender Zellen nach LLO-Behandlung die T-Zell-Proliferation inhibierten (224, 225). Darüber hinaus induzierte LLO in sublytischen Mengen die Apoptose muriner dendritischer Zellen (175). Humane DC waren jedoch in der Lage, T-Zellen trotz LLO-Behandlung normal zu stimulieren.

Bei weitergehenden Versuchen zur genaueren Charakterisierung der LLO-vermittelten Inhibition im Human-System zeigte sich, daß sich der Mechanismus der T-Zell-Inhibition hier grundlegend von dem im Maus-System beschriebenen unterschied. In letzterem schien die LLO-Behandlung dazu zu führen, daß statt stimulatorischer Antigen/MHCII-Komplexe verstärkt inhibitorische Komplexe zur Zelloberfläche transportiert wurden. Diese anergisierten die T-Zellen, so daß sie auch mit unbehandelten APC nicht wieder restimuliert werden konnten. Die Bildung inhibitorischer MHCII-Komplexe benötigte eine längere Prozessierungszeit des Antigens und wurde nur beobachtet, wenn die APC mit nativem Protein, nicht aber wenn sie mit dem von den T-Zellen erkannten Peptid inkubiert wurden. Das wichtigste Argument für eine spezifische T-Zell-Inaktivierung im Maussystem war in diesem Zusammenhang schließlich die Beobachtung, daß LLO-behandelte APC, die mit Protein und Peptid inkubiert wurden, T-Zellen inhibierten, obwohl mit Peptid allein keine Inhibition induziert werden konnte (225).

Bei humanen LLO-behandelten Monozyten hatte die Dauer der Prozessierung des Proteins keinen Einfluß auf die Inhibition der T-Zell-Proliferation. Auch wenn das Antigen und die T-Zellen sofort nach der LLO-Behandlung zugegeben wurden, fiel die T-Zell-Proliferation nicht stärker aus als nach vierstündiger Prozessierung des Antigens vor Zugabe der T-Zellen. Darüber hinaus trat die Inhibition sowohl mit nativem Protein als auch mit Peptid auf. Beide Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, daß es sich bei der Inhibition durch LLO im Human-System um eine eher allgemeine Störung der Antigen-Präsentation handeln mußte. Die Blockierung der Antigen-Prozessierung in Monozyten führte schließlich auf den T-Zellen zu einer verringerten Internalisierung der T-Zell-Rezeptoren, so daß diese Zellen vermutlich nicht das zur vollen Stimulation benötigte Signal erhielten. Die Expression kostimulatorischer Moleküle auf den Monozyten wurde hingegen durch LLO nicht beeinflusst. Schließlich induzierten LLO-behandelte PBMC auch keine T-Zell-Anergie. "Inhibierte" T-Zellen konnten in sekundären Kulturen mit unbehandelten APC und Antigen normal stimuliert werden. Allerdings war auch die im Mausmodell beschriebene T-Zell-Anergie nur von kurzer Dauer gewesen (224).

Unklar ist, warum dendritische Zellen und EBV-B-Zellen gegenüber LLO so viel unempfindlicher sind als Monozyten. Die Möglichkeit, daß evtl. resistente Zellen gar kein LLO binden, wurde durch Analyse dieser Zellen nach LLO-Behandlung im Durchflußzytometer ausgeschlossen. LLO konnte sowohl auf

der Oberfläche von Monozyten als auch von dendritischen Zellen und EBV-B-Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Es stellt sich die Frage, ob die Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Listerien zumindest in der Maus *in vivo* einen Vorteil verschafft, da die spezifische Immunantwort gegen diesen Erreger hauptsächlich durch CTL vermittelt wird und einige Autoren sogar eine protektive Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Modell anzweifeln (vgl. Kap. 1.4.2). Nicht in dieser Arbeit beschriebene Experimente zeigten, daß es möglich war, eine protektive CTL-Antwort gegen *L. monocytogenes* ohne gleichzeitige Induktion spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren (254). Allerdings konnte durch diese Experimente nicht ausgeschlossen werden, daß CD4<sup>+</sup> T-Zellen eventuell zur Aufrechterhaltung von aktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Listerien benötigt werden, ähnlich wie bei chronischen LCMV-Infektionen (262, 263). Direkte Experimente mit Deletionsmutanten zur möglichen Bedeutung der T-Zell-Inhibition bei der Immunabwehr gegen *L. monocytogenes* sind nicht möglich, da LLO aufgrund seiner lytischen Aktivität eine zentrale Rolle im Infektionszyklus spielt und die lytische Funktion bisher nicht von der Induktion der Inhibition getrennt werden konnte. Indirekte Hinweise auf eine Bedeutung der LLO-vermittelten Inhibition *in vivo* ergeben sich aus Experimenten, in denen gezeigt wurde, daß eine Infektion mit subletalen Dosen LLO-exprimierender *L. monocytogenes* die Bildung spezifischer Antikörper (welche durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterstützt wird) gegen später injizierte Proteine transient unterdrückt (264).

#### 4.2.1 Infektion dendritischer Zellen mit *L. monocytogenes*

Die Resistenz humaner dendritischer Zellen gegen die LLO-Behandlung könnte theoretisch darauf zurückzuführen sein, daß gereinigtes LLO nicht effizient in die Endosomen gelangte, um dort mit der Antigen-Prozessierung zu interferieren. LLO, das direkt in den Endosomen durch aufgenommene Listerien produziert wird, könnte demnach möglicherweise selbst in DC die Antigen-Präsentation beeinträchtigen. Allerdings war nicht bekannt, ob humane dendritische Zellen überhaupt durch Listerien infiziert werden können. Für murine dendritische Zellen war bekannt, daß sie durch Listerien infiziert und in Apoptose getrieben werden, wofür LLO verantwortlich ist (175, 248). Dies wurde als Mechanismus angesehen, die Immunantwort zu beeinträchtigen. Es lagen im Maussystem ebenfalls keine Daten zum Einfluß der Listerien auf die Antigen-Präsentation durch DC vor, allerdings war beschrieben worden, daß die Antigen-Präsentation muriner Makrophagen durch LLO inhibiert wurde (222, 223).

Die Infektionsexperimente humaner dendritischer Zellen mit *L. monocytogenes* und verschiedenen Mutanten zeigten, daß unreife DC durch *L. monocytogenes* effizient infiziert werden konnten. Die Expression von hämolytisch aktivem LLO war für eine effiziente Infektion unerlässlich. LLO-Deletions-

mutanten zeigten nur eine Infektionseffizienz von 20 % verglichen mit dem Wildtyp. Internalin A und B, welche die aktive Aufnahme von Listerien durch nicht-phagozytische Zellen induzieren können, sowie das verwandte IrpA wurden hingegen nicht benötigt. Allerdings konnte in diesen Versuchen, in denen infizierte Zellen lysiert und die Zahl der lebenden Bakterien bestimmt wurde, nicht unterschieden werden, ob die Listerien sich in den Phagosomen oder im Zytosol befanden. Durch Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß *L. monocytogenes* aus dem Phagosom entkam und im Zytosol Aktin akkumulierte. Auch die LLO-Deletionsmutante war in der Lage, das Phagosom zu verlassen, allerdings mit deutlicher zeitlicher Verzögerung (K.E.J. Dittmar, persönliche Mitteilung). Diese führte zu der deutlich reduzierten Zahl lebender Bakterien nach Zellyse, da sich die Bakterien im Phagosom nicht vermehren können.

Infizierte dendritische Zellen waren in der Lage, sowohl exogenes Antigen als auch in den Phagosomen produziertes LLO zu prozessieren und TT- oder LLO-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen genauso effizient zu stimulieren wie mit *L. monocytogenes*  $\Delta$ hly2 infizierte oder uninfizierte Kontrollzellen. Diese Daten bestätigten die Ergebnisse der Versuche mit gereinigtem LLO und unterstrichen die Resistenz humaner dendritischer Zellen gegen die inhibitorische Aktivität, die im Maussystem gefunden worden war. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß nicht infizierte dendritische Zellen für die T-Zell-Stimulation verantwortlich waren. Dagegen spricht jedoch, daß infizierte DC LLO-spezifische T-Zellen stimulierten. Sollten diese T-Zellen nur durch nicht-infizierte DC stimuliert worden sein, müßte das LLO von Listerien stammen, welche nicht aufgenommen wurden und LLO in den Kulturüberstand abgaben. Dies ist aufgrund der effizienten Stimulation unwahrscheinlich. Eine endgültige Klärung dieser Frage wäre möglich, wenn die Stimulation spezifischer T-Zellen durch infizierte DC auf Einzelzellniveau, z.B. durch Messung des Ca<sup>2+</sup>-Flux in stimulierten T-Zellen mit Hilfe konfokaler Lichtmikroskopie, gezeigt werden könnte. Entsprechende Experimente waren bei Abschluß dieser Arbeit in Vorbereitung.

### **4.3 Stimulation CD1-restringierter DN T-Zellen durch *Listeria monocytogenes***

Neben den relativ gut charakterisierten konventionellen T-Zellen existiert eine heterogene Gruppe von nicht-konventionellen T-Zellen, deren Funktion nur unvollständig verstanden ist. Zu ihnen gehören DN T-Zellen. Im Menschen sind diese Zellen durch nicht-polymorphe, MHC I-ähnliche CD1-Moleküle restringiert, welche exogene Antigene präsentieren. Bei diesen handelt es sich durchweg um Verbindungen, die typischerweise einen Lipid- und einen Kohlenhydratanteil aufweisen. Solche Verbindungen sind häufig Zellwandbestandteile von Bakterien, wie z.B. das aus Mycobakterien isolierte

Glykolipid Lipoarabinomannan (LAM). Sie könnten daher ein vom Immunsystem leicht zu erkennendes Motiv darstellen, ähnlich wie formylierte Peptide, die im MHC-System durch H2-M3 präsentiert werden. Die Moleküle CD1a, b und c werden nur von einigen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und aktivierten Monozyten exprimiert. Da sie strukturell sehr konservierte Antigene präsentieren, sollten die mit ihnen interagierenden DN T-Zellen relativ schnell und unabhängig von vorhergehendem Kontakt mit einem Pathogen auf durch CD1 präsentierte Antigene reagieren können. Solche Zellen könnten daher eine Rolle bei der Induktion der Immunantwort gegen viele verschiedene bakterielle Pathogene, so auch *L. monocytogenes*, spielen.

Mit Hilfe Lysat-beladener dendritischer Zellen wurden angereicherte CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen wiederholt stimuliert und anschließend auf Antigen-Spezifität getestet. Es zeigte sich, daß der überwiegende Teil der so erhaltenen DN T-Zelllinien autoreaktiv war, also unabhängig von *L. monocytogenes*-Lysat proliferierte. Alle Linien waren jedoch CD1-restringiert, da nur CD1-positive Zielzellen lysiert wurden. Dabei konnten alle drei Isoformen, CD1a, b oder c, als Restriktionselement dienen. Auch die Lyse war unabhängig von der Anwesenheit des Antigens. Dendritische Zellen konnten also sehr effektiv autoreaktive DN T-Zellen stimulieren.

Einige der Linien enthielten neben autoreaktiven auch spezifische Zellen, da in der Gegenwart von Lysat die Proliferation anstieg. Aus einer Linie konnten DN-T-Zellklone isoliert werden, welche Antigen-spezifisch proliferierten, aber CD1-positive Zellen ohne Zugabe von Antigen lysierten. Sowohl Proliferation als auch lytische Aktivität dieser Klone waren CD1c-restringiert. Es ist unklar, warum die Proliferation dieser Klone in Gegenwart von *L. monocytogenes*-Lysat anstieg, die lytische Aktivität aber nur von der Expression von CD1c auf den Zielzellen abhing. Möglicherweise reichte für die Induktion der Killer-Funktion durch die DN-T-Zellklone unbeladenes bzw. mit Autoantigen beladenes CD1c aus. Für die Proliferation würde dann ein stärkeres Signal benötigt, das die Zellen nur erhielten, wenn CD1c mit *L. monocytogenes*-Komponenten beladen war. Auch bei klassischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen reicht für die Auslösung der zytotoxischen Aktivität ein wesentlich schwächeres Signal aus als für die Proliferation (120, 121). Alternativ könnte Lysat von *L. monocytogenes* lediglich die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle induzieren, ohne daß im Lysat enthaltene Antigene auf CD1 geladen würden. Die kostimulatorischen Moleküle würden dann das zur Proliferation benötigte zweite Signal liefern, während der T-Zell-Rezeptor der DN T-Zellen nur "leeres" CD1 erkennt. Für die Lyse CD1-positiver Zielzellen hingegen würde die alleinige Erkennung von CD1 ausreichen. Welcher Art solche kostimulatorischen Moleküle sein könnten, ist zur Zeit unbekannt. Die meisten DN T-Zellen exprimieren kein CD28, werden also nicht über das von DC exprimierte B7 kostimuliert. Daten einer anderen Gruppe legen die Vermutung nahe, daß bisher unidentifizierte kostimulatorische Moleküle dessen Funktion bei der Stimulation von DN T-Zellen übernehmen (75). In vorläufigen Experimenten

zeigte die Analyse Lysat-beladener dendritischer Zellen im Durchflußzytometer keine wesentliche Veränderung in der Expression von B7-1 oder B7-2 (nicht gezeigt). Allerdings war die Expression von CD44 gesteigert. Dieses Molekül dient über die Bindung an Hyaluronsäure der Zell-Zell-Adhäsion und könnte somit die Stimulation der T-Zellen unterstützen.

Es stellt sich die Frage, warum der größte Teil der DN T-Zelllinien autoreaktiv war und ob solche autoreaktiven Zellen eine Funktion in der Immunantwort ausüben. Weiterhin ist nicht bekannt, ob CD1a, b und c in nicht infizierten Zellen unbeladen oder beladen mit einem zelleigenen Antigen die Oberfläche erreichen. Daten, welche für CD1d und die durch CD1d restringierten NK T-Zellen vorliegen, können hier jedoch einige Hinweise liefern. Die in der Maus und im Menschen beschriebenen CD1d-restringierten NK T-Zellen erkennen anscheinend ebenfalls Autoantigene. Kürzlich wurde ein natürlicher Ligand des Restriktionsmoleküls CD1d identifiziert. Dabei handelt es sich um ein eukaryontisches Glykolipid, das strukturelle Ähnlichkeit mit den bisher bekannten bakteriellen Liganden für CD1a-c aufweist (82). Daten aus dem Maussystem zeigen, daß NK T-Zellen in der Leber in der frühen Phase einer listeriellen Infektion eine Rolle zu spielen scheinen. Diese Zellen produzieren innerhalb einer halben Stunde nach der Infektion große Mengen IL-4, wodurch die Ausschüttung des Chemokins MCP-1 durch Makrophagen gesteigert und so der Influx von Monozyten verstärkt wird. Die NK T-Zellen werden sehr schnell wieder herabreguliert, da IL-4 in der späten Phase der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* einen schädlichen Effekt ausübt (88). Zusätzlich hierzu schlagen andere Autoren eine Helfer-Funktion für NK T-Zellen bei der Induktion spezifischer CTL während einer Infektion mit einem anderen intrazellulären Pathogen, *Toxoplasma gondii*, vor (89).

CD1a-c-restringierte DN T-Zellen produzieren vorwiegend IFN- $\gamma$  und könnten so die Funktion von T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen. Bei Infektionen mit *M. tuberculosis*, welche die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren, könnten spezifische DN T-Zellen deren Funktionen, zumindest teilweise, übernehmen. Ähnliches wäre auch bei Infektionen mit *L. monocytogenes* denkbar. Humane dendritische Zellen sind zwar gegen die von Listerien induzierte Störung der Antigen-Präsentation sehr resistent. Dennoch könnten z.B. Monozyten, deren Antigen-Prozessierung durch LLO gestört wird, diesen CD1-restringierten Weg der Präsentation listerieller Zellwandkomponenten nutzen. Zumindest *in vitro* sind Monozyten in der Lage, nach Behandlung mit GM-CSF CD1 zu exprimieren .

Eine weitere mögliche Funktion von DN T-Zellen könnte darin liegen, die Reifung Antigen-präsentierender DC zu beeinflussen. Darauf deuteten eigene Daten hin, die nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit beschrieben wurden. LAM-spezifische DN T-Zellklone produzierten nach Stimulation mit PHA oder LAM große Mengen TNF- $\alpha$ . Unter Einfluß dieses Zytokins reifen dendritische Zellen zumindest *in vitro* aus und erlangen ihre volle stimulatorische Kapazität (6). Solche reifen DC können

direkt zytotoxische T-Zellen aktivieren (57). Die These, daß CD1-restringierte T-Zellen Helfer-Funktion ausüben, indem sie die Reifung dendritischer Zellen induzieren, wird durch Daten einer anderen Gruppe gestützt. Dort führte die Kokultivierung von CD1d-restringierten T-Zellen und DC dazu, daß letztere, wenn sie mit einem normalerweise schwach immunogenen CTL-Epitop beladen wurden, effizient CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren konnten (P. Dellabona, persönliche Mitteilung). Ob die *L. monocytogenes*-spezifischen DN T-Zellen TNF- $\alpha$  produzierten und welchen Einfluß sie auf dendritische Zellen *in vitro* ausüben, konnte nicht mehr geklärt werden. Es wäre sehr aufschlußreich, zu untersuchen, ob und in welcher Weise DN T-Zellen die Reifung dendritischer Zellen induzieren können. Dabei wären Versuche mit infizierten statt Lysat-beladener DC interessant. Wie zuvor gezeigt, können humane dendritische Zellen effektiv durch *L. monocytogenes* infiziert werden, sind aber trotzdem in der Lage, T-Zellen zu stimulieren. DN T-Zellen besitzen lytische Funktion, könnten aber auch eine Rolle als Helfer-T-Zellen spielen. Es wäre interessant, zu erfahren, ob z. B. die Art der Beladung dendritischer Zellen mit Antigen - durch Inkubation mit Lysat oder durch Infektion - die Effektorfunktionen doppelt-negativer T-Zellen beeinflußt.

Insgesamt verdeutlichen die hier gezeigten Daten die Notwendigkeit, im Tiermodell gewonnene Erkenntnisse, soweit möglich, im Human-System zu überprüfen. Das Mausmodell ermöglicht, Vorgänge bei der Immunabwehr gegen Pathogene *in vivo* zu untersuchen. Jedoch zeigen sich mitunter deutliche Unterschiede zum Human-System. So ist z. B. fraglich, ob Antikörper, wie Daten aus dem Mausmodell nahelegten, tatsächlich keine protektive Funktion bei Infektionen bzw. Kolonisierung mit *L. monocytogenes* ausüben. Dabei sollte beachtet werden, daß in solchen Modellen im allgemeinen nicht der natürliche Infektionsweg über den Darm benutzt wird. Die Tatsache aber, daß gesunde Personen nach Kontakt mit Listerien spezifische Antikörper aufweisen, impliziert, daß diese durchaus eine protektive Funktion, evtl. durch Verhinderung einer Infektion, ausüben könnten.

Weiterhin zeigten sich auf der Seite Antigen-präsentierender Zellen ausgeprägte Unterschiede zum Mausmodell. Humane DC, welche eine zentrale Rolle bei der Induktion sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten Immunantwort einnehmen, sind gegenüber der durch LLO oder lebende Listerien vermittelten Störung der Antigen-Prozessierung deutlich resistenter als murine dendritische Zellen. Sie werden zwar effektiv infiziert, stimulieren aber dennoch T-Helferzellen in normaler Weise. Diese Tatsache impliziert, daß attenuierte, rekombinante *L. monocytogenes* im Menschen evtl. als sicherer Lebendimpfstoff eingesetzt werden könnten, da hier die aus dem Maussystem bekannten inhibitorischen Effekte nicht auftreten.

Schließlich zeigten die zu DN T-Zellen gesammelten Ergebnisse, zusammen mit bereits publizierten Daten, daß die klassische Vorstellung, die Funktion des erworbenen Immunsystems beruhe vorwiegend



auf der möglichst spezifischen Erkennung bestimmter Protein-Antigene, nur beschränkt richtig ist. Vielmehr existieren auch Komponenten des spezifischen Immunsystems - die DN T-Zellen - die zwar, da sie einen variablen TcR besitzen, theoretisch ein genauso vielfältiges Antigen-Repertoire erkennen könnten wie klassische T-Zellen, aufgrund ihrer Restriktion durch CD1 jedoch Strukturen mit stark eingeschränkter Variabilität erkennen. Sie stehen somit an der Grenze zwischen angeborener und erworbener Immunität.

Interessant ist, daß DN T-Zellen häufig autoreaktiv sind, d. h. CD1 ohne Zugabe von Antigen erkennen, teilweise aber bestimmte Effektorfunktionen (Proliferation) in Antigen-spezifischer Weise ausgelöst werden können. Experimentelle Systeme, mit deren Hilfe die genaue Funktionsweise dieser T-Zell-Population aufgeklärt werden könnte, sollten daher auch wichtige Erkenntnisse darüber liefern, ob autoreaktive Erkennung körpereigener Strukturen, zumindest in einigen Fällen, nicht auch eine normale Eigenschaft bestimmter Komponenten des Immunsystems sein kann.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit war in drei Teile gegliedert, in denen Aspekte der Interaktion von *Listeria monocytogenes* mit dem humanen Immunsystem bearbeitet wurden: die spezifische humorale Immunantwort, die Interaktion mit der Antigen-Prozessierung und die Induktion CD1-restringierter DN T-Zellen.

Hier wurde erstmals eine detaillierte Analyse der humanen Antikörperantwort gegen *L. monocytogenes* durchgeführt. Überraschenderweise scheinen in gesunden Spendern, die Kontakt zu Listerien gehabt hatten, fast ausschließlich zwei sekretierte Virulenzfaktoren, LLO und IrpA als Protein-Antigene für die spezifische humorale Immunantwort zu dienen. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Listeriose-Patienten hingegen besaßen Antikörper gegen ein breites Spektrum listerieller Proteine. Sie erkannten zusätzlich ActA, InlB und p60 sowie ein Protein, bei dem es sich vermutlich um eine unprozessierte Form von IrpA handelte. Die Analyse der Antikörper-Antwort ermöglicht die Unterscheidung zwischen Spendern, die nur mit Listerien in Kontakt gekommen und solchen, die an Listeriose erkrankt waren. Eine Abschätzung der tatsächlichen Gefährdung durch *L. monocytogenes* war bisher schwierig, da meist nur lokal begrenzte Epidemie-artige Ausbrüche gut dokumentiert waren, während vereinzelt auftretende Infektionen aufgrund der grippeähnlichen Symptome unerkant bleiben könnten. Die hier gesammelten Daten zeigten auch, daß beim Testen größerer Personengruppen auf die Inzidenz von Listerien-Kontakt die Antikörperantwort gegen mehrere listerielle Proteine geprüft werden muß, da z.B. gesunde Spender häufig nur eines der beiden Hauptantigene, LLO oder IrpA, erkannten.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Störung der Antigen-Prozessierung durch *L. monocytogenes* im Menschen. Da Listerien während ihres Infektionszyklus das Phagosom unter anderem von Antigen-präsentierenden Zellen passieren und dieses mit Hilfe des Porenbildners LLO durchbrechen, interferieren sie dabei zwangsläufig auch mit deren MHC II-abhängiger Antigen-Präsentation. Dies führt im Mausmodell *in vitro* zu einer spezifischen Inaktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Im Human-System zeigten sich deutliche Unterschiede zum Mausmodell. So stört LLO im Menschen zwar generell die Antigen-Prozessierung durch bestimmte APC (PBMC und Monozyten), Hinweise auf eine gezielte Inaktivierung spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden jedoch nicht gefunden. Darüberhinaus erwiesen sich humane dendritische Zellen als überaus resistent gegen die Störung der Antigen-Prozessierung durch LLO oder lebende Listerien und präsentierten sowohl exogene als auch durch *L. m.* im Phagosom produzierte Proteine in normaler Weise. Die Resistenz dieser APC, die eine zentrale Position in der Stimulation spezifischer T-Zellen bei Infektionen einnehmen, könnte einer der Gründe sein, warum Listerien für gesunde Menschen kaum eine Bedrohung darstellen. Rekombinante Listerien

wurden experimentell bereits erfolgreich als Vaccine Carrier zur Induktion spezifischer muriner CTL eingesetzt, während ihr Nutzen für die Induktion einer gleichzeitigen T-Helfer-Antwort aufgrund der aus der Maus bekannten Inhibition von CD4<sup>+</sup> T-Zellen fraglich war. Die hier gesammelten Daten zeigen jedoch, daß Listerien grundsätzlich ein Potential zur Entwicklung rekombinanter Lebendimpfstoffe im Menschen bieten.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die mögliche Rolle von CD1-restringierten DN T-Zellen bei der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* untersucht. Solche Zellen spielen vermutlich eine Rolle in der frühen Phase der Immunantwort gegen bakterielle Erreger. Sie erkennen sehr konservierte Strukturen (Glykolipide), die in vielen Bakterien vorkommen und wohl ein durch das Immunsystem leicht zu erkennendes strukturelles Motiv darstellen. Ähnliche Strukturen kommen aber auch in eukaryontischen Membranen vor. Tatsächlich besaß der überwiegende Teil der hier isolierten DN T-Zelllinien autoreaktive Eigenschaften, d. h. diese Zellen wurden durch CD1 in Abwesenheit äußerlich zugegebenen Antigens zur Proliferation und zur Lyse CD1-positiver Zielzellen angeregt. Aus einigen Linien konnten jedoch *L. monocytogenes*-spezifische Klone isoliert werden, welche bemerkenswerte Eigenschaften aufwiesen. So proliferierten sie Antigen-abhängig, lysierten jedoch gleichzeitig CD1-positive Zielzellen in autoreaktiver Weise. Möglicherweise ist die Autoreaktivität aber eine normale Eigenschaft von DN T-Zellen. Dies wird auch durch Daten anderer Gruppen gestützt. Die Aufklärung der Funktionsweise dieser Zellen sowie der zur Aktivierung ihrer verschiedenen Effektorfunktionen benötigten Signale sollte ein besseres Verständnis früher Vorgänge bei bakteriellen Infektionen ermöglichen. Gleichzeitig kann dieses System zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit Autoreaktivität eine "gewollte" Eigenschaft bestimmter Komponenten des Immunsystems sein könnte.

Abschließend bleibt festzustellen, daß im Mausmodell gesammelte Daten zwar für das Verständnis des Immunsystems unerläßlich sind, jedoch gleichzeitig im Human-System, soweit möglich, überprüft werden müssen. Gerade die hier gezeigten Daten verdeutlichen, daß Erkenntnisse aus dem Mausmodell und die daraus abgeleiteten Theorien nicht in allen Fällen für unser eigenes Immunsystem zutreffen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (Sigma, Deisenhofen)
BHI	Brain Heart Infusion; Komplexmedium für die Kultur von Listerien
β2m	beta-2-Mikroglobulin
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DC	Dendritische Zelle
DMF	Dimethylformamid
DN T-Zellen	CD4/CD8 Doppelt-negative T-Zellen
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
GM-CSF	Granulocyte/Monocyte Colony Stimulating Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
IEL	Intestinal Intraepithelial Lymphocyte
IFN-γ	Interferon-γ
Ii	invariante Kette
IL	Interleukin
kDa	kilo-Dalton
LLO	Listeriolysin O
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
NBT	Nitroblue Tetrazolium (Sigma, Deisenhofen)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
rpmi	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamid gelelectrophoresis
TAP	Transporter associated with Antigen Presentation
TBS	Tris buffered saline (100 mM Tris, 154 mM NaCl, pH7,5)
TTBS	TBS plus 0,1 % Tween 20
TCA	Tri-chloro acetic acid
TCR	T Cell Receptor
T <sub>H</sub>	Helfer-T-Zelle

## 6.2 Literatur

1. Kaufmann, S. H. E., D. Kabelitz (1998). Introduction: the immune response to infectious agents. *Meth. Microbiol.* **25**: 1-19
2. Tomlinson, S. (1993). Complement defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 83-89
3. Paulnock, D. M. (1992). Macrophage activation by T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **4**: 344-349
4. Janeway, C. A., P. Travers (1997). *Immunobiology*. 3 ed. London: Current Biology Ltd.
5. Kaufmann, S. H. E. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 129-1163
6. Cella, M., F. Sallusto, A. Lanzavecchia (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 10-16
7. Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells. *Immunol. Today*. **18**: 350-61
8. Tew, J. G., J. Wu, D. Qin, S. Helm, G. F. Burton, A. K. Szakal (1997). Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol. Rev.* **156**: 39-52
9. Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, A. Poggi, M. C. Mingari, L. Moretta (1997). Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **155**: 105-17
10. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari, L. Moretta (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 619-48
11. Bancroft, G. J. (1993). The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 503-510
12. Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, T. M. Kündig, S. Oehen, H. Pirchet, H. Hengartner (1996). On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 333-367
13. Carayannopoulos, L., J. D. Capra. 1993. Immunoglobulins: structure and function. 3 ed. In *Fundamental Immunology*, ed. W. E. Paul. New York: Raven Press
14. Fremont, D. H., W. A. Rees, H. Kozono (1996). Biophysical studies of T cell receptors and their ligands. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 93-100
15. Boehmer, H. v. (1993). The developmental biology of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 309-326
16. Goodnow, C. C., J. G. Cyster, S. B. Hartley, S. E. Bell, M. P. Cooke, J. I. Healy, S. Akkaraju, J. C. Rathmell, S. L. Pogue, K. P. Shokat (1995). Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv. Immunol.* **59**: 279-368
17. Rolink, A., F. Melchers (1993). B-lymphopoiesis in the mouse. *Adv. Immunol.* **53**: 123-156
18. Matsuda, F., T. Honjo (1996). Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv. Immunol.* **62**: 1-29
19. Franco, A. L. d. (1987). Molecular aspects of B-lymphocyte activation. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **3**: 143-178
20. Mond, J. J., A. Lees, C. M. Snapper (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 655-92
21. Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 331-340

22. Foy, T. M., A. Aruffo, J. Bajorath, J. E. Buhlmann, R. J. Noelle (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 591-617
23. MacLennan, I. C. M. (1994). Germinal centres. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 117-139
24. Cyster, J. G., S. B. Hartley, C. C. Goodnow (1994). Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire [see comments]. *Nature.* **371**: 389-95
25. Wagner, S. D., M. S. Neuberger (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 441-457
26. Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 199-205
27. Tew, J. G., R. M. DiLosa, G. F. Burton, M. H. Kosco, L. I. Kupp, A. Masuda, A. K. Szakal (1992). Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol. Rev.* **126**: 99-112
28. Fischetti, V. A., D. Bessen. 1989. Effect of mucosal antibodies to M protein in colonization by group A streptococci. In *Molecular mechanisms of microbial adhesion*, eds. L. Switalski, M. Hook, E. Beachery, 128-142. New York: Springer
29. Gounni, A. S., B. Lamkhieoued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, M. Capron (1994). High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.* **367**: 183-6
30. Bochner, B. S., B. J. Undem, L. M. Lichtenstein (1994). Immunological aspects of allergic asthma. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 295-335
31. Bentley, G. A., R. A. Mariuzza (1996). The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 563-590
32. Zheng, B., W. Xue, G. Kelsoe (1994). Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells. *Nature.* **372**: 556-9
33. Chien, Y. H., R. Jores, M. P. Crowley (1996). Recognition by  $\gamma/\delta$  T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 511-32
34. von Boehmer, H. (1988). The developmental biology of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 309-26
35. Strasser, A. (1995). Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 228-34
36. Nossal, G. J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell.* **76**: 229-39
37. von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell.* **76**: 219-28
38. Picker, L. J., E. C. Butcher (1993). Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 393-390
39. Malissen, B., M. Malissen (1996). Functions of TCR and preTCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 394-401
40. Janeway, C. A., Jr. (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **10**: 645-74
41. Cantrell, D. (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 259-274
42. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, J. A. Bluestone (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 233-58

43. Thompson, C. B., J. P. Allison (1997). The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity*. **7**: 445-450
44. Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. **76**: 287-299
45. Ortega Barria, E., M. E. Pereira (1992). Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. *Infect. Agents Dis.* **1**: 136-45
46. Cossart, P., M. Lecuit (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* **17**: 3797-3806
47. Bouwer, H. G., R. A. Barry, D. J. Hinrichs (1997). Acquired immunity to an intracellular pathogen: immunologic recognition of *L. monocytogenes*-infected cells. *Immunol. Rev.* **158**: 137-146
48. Nickell, S. P., G. A. Stryker, C. Arevalo (1993). Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J. Immunol.* **150**: 1446-57
49. Jondal, M., R. Schirmbeck, J. Reimann (1996). MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity*. **5**: 295-302
50. Reimann, J., S. H. E. Kaufmann (1997). Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 462-469
51. Griffiths, G. M. (1995). The cell biology of CTL killing. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 343-348
52. Smyth, M. J., J. A. Trapani (1995). Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol. Today*. **16**: 202-206
53. Lowin, B., M. C. Peitsch, J. Tschopp (1995). Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **198**: 1-24
54. Stenger, S., D. A. Hanson, R. Teitelbaum, P. Dewan, K. R. Niazi, C. J. Froelich, T. Ganz, S. Thomas-Uszynski, A. Melián, C. Bogdan, S. A. Porcelli, B. R. Bloom, A. M. Krensky, R. L. Modlin (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. **282**: 121-125
55. Golstein, P. (1995). Fas-based T cell-mediated cytotoxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **198**: 25-37
56. Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, P. Golstein (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. **265**: 528-30 issn: 0036-8075
57. Lanzavecchia, A. (1998). Licence to kill. *Nature*. **393**: 413-414
58. Mosmann, T. R. (1993). T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **664**: 89-92
59. Rogge, L., L. Barberis Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, F. Sinigaglia (1997). Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* **185**: 825-31
60. Mocci, S., S. A. Dalrymple, R. Nishinakamura, R. Murray (1997). The cytokine stew and innate resistance to *L. monocytogenes*. *Immunol. Rev.* **158**: 107-14

61. Gorak, P. M., C. R. Engwerda, P. M. Kaye (1998). Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* **28**: 687-95 issn: 0014-2980
62. von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D. L. Sacks, M. C. Udey (1998). Uptake of *Leishmania* major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J. Exp. Med.* **188**: 1547-52 issn: 0022-1007
63. Launois, P., F. Tacchini Cottier, C. Parra Lopez, J. A. Louis (1998). Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. *Int. Rev. Immunol.* **17**: 157-80
64. Smith, G. P., V. M. Dabhi, E. G. Pamer, K. F. Lindahl (1994). Peptide presentation by the MHC class Ib molecule, H2-M3. *Int. Immunol.* **6**: 1917-1926
65. Shawar, S. M., J. M. Vyas, J. R. Rodgers, R. R. Rich (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 839-880
66. Lenz, L. L., M. J. Bevan (1996). H2-M3-restricted presentation of *Listeria monocytogenes* antigens. *Immunol. Rev.* **151**: 107-121
67. Porcelli, S. A. (1995). The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv. Immunol.* **59**: 1-98
68. Blumberg, R. S., D. Gerdes, A. Chott, S. A. Porcelli, S. P. Balk (1995). Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol. Rev.* **147**: 5-29
69. Sugita, M., R. M. Jackman, D.-E. van, S. M. Behar, R. A. Rogers, P. J. Peters, M. B. Brenner, S. A. Porcelli (1996). Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MHCs. *Science*. **273**: 349-52
70. Melián, A., E. M. Beckman, S. A. Porcelli, M. B. Brenner (1996). Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 82-88
71. Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong, M. B. Brenner (1994). Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted  $\alpha\beta^+$  T cells. *Nature*. **372**: 691-694
72. Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan, R. L. Modlin (1995). CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science*. **269**: 227-230
73. Prigozy, T. I., P. A. Sieling, D. Clemens, P. L. Stewart, S. M. Behar, S. A. Porcelli, M. B. Brenner, R. L. Modlin, M. Kronenberg (1997). The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity*. **6**: 187-197
74. Bendelac, A. (1995). CD1: Presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science*. **269**: 185-186
75. Behar, S. M., S. A. Porcelli, E. M. Beckman, M. B. Brenner (1995). A pathway of costimulation that prevents anergy in CD28<sup>-</sup> T cells: B7-independent costimulation of CD1-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **182**: 2007-2018
76. Fairhurst, R. M., C.-X. Wang, P. A. Sieling, R. L. Modlin, J. Braun (1998). CD1-restricted T cells and resistance to polysaccharide-encapsulated bacteria. *Immunol. Today*. **19**: 257-259



77. Stenger, S., R. J. Mazzaccaro, K. Uyemura, S. Cho, P. F. Barnes, J. P. Rosat, A. Sette, M. B. Brenner, S. A. Porcelli, B. R. Bloom, R. L. Modlin (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*. **276**: 1684-1687
78. Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, R. R. Brutkiewicz (1995). CD1 recognition by mouse NK1<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science*. **268**: 863-865
79. Davodeau, F., M. A. Peyrat, A. Necker, R. Dominici, F. Blanchard, C. Leget, J. Gaschet, P. Costa, Y. Jacques, A. Godard, H. Vie, A. Poggi, F. Romagne, M. Bonneville (1997). Close phenotypic and functional similarities between human and murine  $\alpha\beta$  T cells expressing invariant TCR  $\alpha$ -chains. *J. Immunol.* **158**: 5603-11 issn: 0022-1767
80. Castano, A. R., S. Tangri, J. E. W. Miller, H. R. Holcombe, M. R. Jackson, W. D. Huse, M. Kronenberg, P. A. Peterson (1995). Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science*. **269**: 223-226
81. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, M. Taniguchi (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. **278**: 1626-1629
82. Joyce, S., A. S. Woods, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, A. D. D. Silva, A. Boesteanu, S. P. Balk, R. J. Cotter, R. R. Brutkiewicz (1998). Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science*. **279**: 1541-1544
83. Maher, J. K., M. Kronenberg (1997). The role of CD1 molecules in immune responses to infection. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 456-461
84. Yoshimoto, T., A. Bendelac, C. Watson, J. Hu-Li, W. E. Paul (1995). Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a T<sub>H</sub>2 response and in immunoglobulin E production. *Science*. **270**: 1845-1847
85. Wilson, S. B., S. C. Kent, K. T. Patton, T. Orban, R. A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D. A. Schatz, M. A. Atkinson, S. P. Balk, J. L. Strominger, D. A. Hafler (1998). Extreme Th1 bias of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells in type 1 diabetes. *Nature*. **391**: 177-181
86. Matsuzaki, G., X.-Y. Li, T. Kadana, F. Song, K. Hiromatsu, H. Yoshida, K. Nomoto (1995). Early appearance of T cell receptor  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T cells with a skewed variable region repertoire after infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1985-1991
87. Emoto, M., Y. Emoto, S. H. Kaufmann (1995). Interleukin-4-producing CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> TCR  $\alpha/\beta$  intermediate liver lymphocytes are down-regulated by *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3321-5
88. Kaufmann, S. H., M. Emoto, G. Szalay, J. Barsig, I. E. Flesch (1997). Interleukin-4 and listeriosis. *Immunol. Rev.* **158**: 95-105
89. Denkers, E. Y., T. Scharton-Kersten, S. Barbieri, P. Caspar, A. Sher (1996). A role for CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8<sup>+</sup> effector function against intracellular infection. *J. Exp. Med.* **184**: 131-139
90. Kronenberg, M. (1994). Antigens recognized by  $\gamma\delta$  T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 64-71
91. Hiromatsu, K., Y. Yoshikai, G. Matsuzaki, S. Ohga, K. Muramori, K. Matsumoto, J. A. Bluestone, K. Nomoto (1992). A protective role of  $\gamma/\delta$  T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Exp. Med.* **175**: 49-56

92. Mombaerts, P., J. Arnoldi, F. Russ, S. Tonegawa, S. H. E. Kaufmann (1993). Different roles of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*. **365**: 53-56
93. Ferrick, D. A., M. D. Schrenzel, T. Mulvania, B. Hsieh, W. G. Ferlin, H. Lepper (1995). Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells *in vivo*. *Nature*. **373**: 255-257
94. Hsieh, B., M. D. Schrenzel, T. Mulvania, H. D. Lepper, L. DiMolfetto Landon, D. A. Ferrick (1996). In vivo cytokine production in murine listeriosis. Evidence for immunoregulation by  $\gamma\delta^+$  T cells. *J. Immunol.* **156**: 232-237
95. de Libero, G., G. Casorati, C. Giachino, C. Carbonara, N. Migone, P. Matzinger, A. Lanzavecchia (1991). Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral  $\gamma\delta$  T Cells. *J. Exp. Med.* **173**: 1311-1322
96. Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. d. Libero, D. Rosa, R. L. Modlin, M. B. Brenner, B. B. Bloom, C. T. Morita (1994). Nonpeptide ligands for human  $\gamma\delta$  T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **9**: 8175-8179
97. Wang, C.-R., A. R. Castano, P. A. Peterson, C. Slaughter, K. Fischer-Lindahl, J. Deisenhofer (1995). Nonclassical binding of forlmylated peptide in crystal structure of the MHC Ib molecule H2-M3. *Cell*. **82**: 655-664
98. Rammensee, H.-G., T. Friede, S. Stevanovic (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. **41**: 178-228
99. Rammensee, H.-G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 85-96
100. Zeng, Z.-H., A. R. Castano, B. W. Segelke, E. A. Stura, P. A. Peterson, I. A. Wilson (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science*. **277**: 339-345
101. Ernst, W. A., J. Maher, S. Cho, K. R. Niazi, D. Chatterjee, D. B. Moody, G. S. Besra, Y. Watanabe, P. E. Jensen, S. A. Porcelli, M. Kronenberg, R. L. Modlin (1998). Molecular interaction of CD1b with lipoglycan antigens. *Immunity*. **8**: 331-340
102. Porcelli, S. A., B. W. Segelke, M. Sugita, I. A. Wilson, M. B. Brenner (1998). The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol. Today*. **19**: 362-368
103. Carrington, M., G. W. Nelson, M. P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J. J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, S. J. O'Brien (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science*. **283**: 1748-52
104. Sinigaglia, F., J. Hammer (1995). Motifs and supermotifs for MHC class II binding peptides. *J. Exp. Med.* **181**: 449-154
105. Hammer, J., P. Valsasnini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takacs, F. Sinigaglia (1993). Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell*. **74**: 197-203
106. Panina-Bordignon, P., A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, A. Lanzavecchia (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* **19**: 2237-2242

107. Todd, J. A., H. Acha Orbea, J. I. Bell, N. Chao, Z. Fronek, C. O. Jacob, M. McDermott, A. A. Sinha, L. Timmerman, L. Steinman, et al. (1988). A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science*. **240**: 1003-9 issn: 0036-8075
108. Davies, J. L., Y. Kawaguchi, S. T. Bennett, J. B. Copeman, H. J. Cordell, L. E. Pritchard, P. W. Reed, S. C. Gough, S. C. Jenkins, S. M. Palmer, et al. (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*. **371**: 130-6 issn: 0028-0836
109. Nepom, G. T., H. Erlich (1991). MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 493-525
110. Murray, J. S. (1998). How the MHC selects Th1/Th2 immunity. *Immunol. Today*. **19**: 157-163
111. Koopmann, J.-O., G. J. Hammerling, F. Momburg (1997). Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 80-88
112. Groettrup, M., A. Soza, U. Kuckelkorn, P.-M. Kloetzel (1996). Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today*. **17**: 429-435
113. Marusina, K., J. J. Monaco (1996). Peptide transport in antigen presentation. *Curr. Opin. Hematol.* **3**: 19-26
114. Momburg, F., J. Roelse, G. J. Hammerling, J. J. Neefjes (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* **179**: 1613-1623
115. Momburg, F., J. Roelse, J. C. Howard, G. W. Butcher (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse, and rat. *Nature*. **367**: 648-651
116. Howard, J. C. (1995). Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 69-76
117. Roelse, J., M. Gromme, F. Momburg, G. Hammerling, J. Neefjes (1994). Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.* **180**: 1591-1597
118. Neefjes, J. J., F. Momburg (1993). Cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 27-34
119. Villanueva, M. S., P. Fischer, K. Feen, E. G. Pamer (1994). Efficiency of MHC class I antigen processing: a quantitative analysis. *Immunity*. **1**: 479-489
120. Valitutti, S., A. Lanzavecchia (1997). Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol. Today*. **18**: 299-304
121. Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T. J. Tsomides, H. N. Eisen (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*. **4**: 565-71
122. Sparer, T. E., L. R. Gooding (1998). Suppression of MHC class I antigen presentation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **232**: 135-47
123. Ojcius, D. M., G. Gachelin, A. Dautry-Varsat (1996). Presentation of antigens derived from microorganisms residing in host-cell vacuoles. *Trends Microbiol.* **4**: 53-59
124. Kovacsics-Bankowski, M., K. L. Rock (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens expressed on MHC I molecules. *Science*. **267**: 243-246
125. Reimann, J., W. Böhm, R. Schirmbeck (1994). Alternative processing pathways for MHC class I-restricted epitope presentation to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **375**: 731-736

126. Norbury, C. C., L. J. Hewlett, A. R. Prescott, N. Shastri, C. Watts (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity*. **3**: 783-791
127. Carbone, F. R., C. Kurts, S. R. M. Bennett, J. F. A. P. Miller, W. R. Heath (1998). Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol. Today*. **19**: 368-373
128. Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*. **84**: 505-507
129. Denzin, L. K., P. Cresswell (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. **82**: 155-165
130. Germain, R. N., F. Castellino, R. Han, C. R. e. Sousa, P. Romagnoli, S. Sadegh-Nasseri, G.-M. Zhong (1996). Processing and presentation of endocytically acquired protein antigens by MHC class II and class I molecules. *Immunol. Rev.* **151**: 5-30
131. Pieters, J. (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 89-96
132. Weenink, S. M., A. M. Gautam (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol. Cell. Biol.* **75**: 69-81
133. Tulp, A., D. Verwoerd, B. Dobberstein, H. L. Ploegh, J. Pieters (1994). Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature*. **369**: 120-126
134. West, M. A., J. M. Lucocq, C. Watts (1994). Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature*. **369**: 147-151
135. Pieters, J. (1997). MHC class II compartments: specialized organelles of the endocytic pathway in antigen presenting cells. *Biol. Chem.* **378**: 751-758
136. Geuze, H. J. (1998). The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today*. **19**: 282-287
137. Sant, A. J., J. Miller (1994). MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 57-63
138. Sugita, M., S. A. Porcelli, M. B. Brenner (1997). Assembly and retention of CD1b heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* **159**: 2358-2365
139. Balk, S. P., S. Burke, J. E. Polischuk, M. E. Frantz, L. Yang, S. Porcelli, S. P. Colgan, R. S. Blumberg (1994).  $\beta$ 2-Microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science*. **265**: 259-262
140. Jackman, R. M., S. Stenger, A. Lee, D. B. Moody, R. A. Rogers, K. R. Niazi, M. Sugita, R. L. Modlin, P. J. Peters, S. A. Porcelli (1998). The tyrosine-containing cytoplasmic tail of CD1b is essential for its efficient presentation of bacterial lipid antigens. *Immunity*. **8**: 341-351
141. Hof, H., A. Ulbricht, G. Stehle (1992). Listeriosis - a puzzling disease. *Infection*. **20**: 54/290-56/292
142. Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, P. M. Griffin (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* **336**: 100-105
143. Riedo, F. X., R. W. Pinner, M. L. Tosca, M. L. Cartter, L. M. Graves, M. W. Reeves, R. E. Weaver, B. D. Plikaytis, C. V. Broome (1994). A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J. Infect. Dis.* **170**: 693-6
144. Hof, H. (1990). Pathogenese und Therapie der Listeriose. *Dtsch. med. Wschr.* **115**: 1639-1646

145. Lorber, B. (1996). Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 1-11
146. Jacquet, C., B. Catimel, R. Brosch, C. Buchrieser, P. Dehaumont, V. Goulet, A. Lepoutre, P. Veit, J. Rocourt (1995). Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2242-6
147. Bula, C. J., J. Bille, M. P. Glauser (1995). An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 66-72
148. Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Gouin, A. D. Klarsfeld, J. Mengaud, P. Cossart (1994). Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**: 187-216
149. Tilney, L. G., D. A. Portnoy (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* **109**: 1597-1608
150. Chakraborty, T., M. Leimeister-Wächter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, S. Notermans (1992). Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriol.* **174**: 568-574
151. Mengaud, J., S. Dramsi, E. Gouin, J. A. Vazquez-Boland, G. Milon, P. Cossart (1991). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**: 2273-2283
152. Portnoy, D. A., T. Chakraborty, W. Goebel, P. Cossart (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**: 1263-1267
153. Lingnau, A., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, J. Wehland (1996). Identification and purification of novel Internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect. Immun.* **64**: 1002-1006
154. Engelbrecht, F., S. K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel, Z. Sokolovic (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* **21**: 823-837
155. Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. Mège, P. Cossart (1996). E-Cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*. **84**: 923-932
156. Hess, J., I. Gentschev, G. Szalay, C. Ladel, A. Bubert, W. Goebel, S. H. E. Kaufmann (1995). *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **63**: 2047-2053
157. Kuhn, M., W. Goebel (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* **57**: 55-61
158. Gutekunst, K. A., L. Pine, E. White, S. Kathariou, G. M. Carlone (1992). A filamentous-like mutant of *Listeria monocytogenes* with reduced expression of a 60-kilodalton extracellular protein invades and grows in 3T6 and Caco-2 cells. *Can. J. Microbiol.* **38**: 843-51
159. Wuenscher, M. D., S. Köhler, A. Bubert, U. Gerike, W. Goebel (1993). The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* **175**: 3491-3501

160. Bubert, A., M. Kuhn, W. Goebel, S. Kohler (1992). Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* **174**: 8166-71
161. Siebers, A., B. B. Finlay (1996). M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* **4**: 22-29
162. Jones, B., L. Pascopella, S. Falkow (1995). Entry of microbes into the host: using M cells to break the mucosal barrier. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 474-8
163. Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, S. Sarnacki, J.-P. Monnet, P. Berche, J.-L. Gaillard (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated loop system. *Infect. Immun.* **66**: 747-755
164. Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, P. Cossart (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* **16**: 251-261
165. Unanue, E. R. (1997). Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 35-43
166. Dramsi, S., S. Lévi, A. Triller, P. Cossart (1998). Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect. Immun.* **66**: 4461-4468
167. Harty, J. T., L. L. Lenz, M. J. Bevan (1996). Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 526-530
168. Trinchieri, G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 17-23
169. Cleveland, M. G., J. D. Gorham, T. L. Murphy, E. Tuomanen, K. M. Murphy (1996). Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect. Immun.* **64**: 1906-1912
170. Tripp, C. S., S. F. Wolf, E. R. Unanue (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **90**: 3725-9
171. Rogers, H. W., M. P. Callery, B. Deck, E. R. Unanue (1996). *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* **156**: 679-84
172. Czuprynski, C. J., M. Haak Friendscho (1997). Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. *Immunol. Rev.* **158**: 47-56
173. Gregory, S. H., E. J. Wing (1998). Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. *Immunol. Today.* **19**: 507-510
174. Merrick, J. C., B. T. Edelson, V. Bhardwaj, P. E. Swanson, E. R. Unanue (1997). Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am. J. Pathol.* **151**: 785-792
175. Guzmán, C. A., E. Domann, M. Rohde, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, K. N. Timmis (1996). Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **20**: 119-126

176. Rogers, H. W., C. S. Tripp, R. D. Schreiber, E. R. Unanue (1994). Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. *J. Immunol.* **153**: 2093-2101
177. North, R. J., P. L. Dunn, J. W. Conlan (1997). Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunol. Rev.* **158**: 27-36
178. Kaufmann, S. H. E., C. H. Ladel (1994). Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knockout mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiol.* **191**: 509-519
179. Ladel, C. H., I. E. A. Flesch, J. Arnoldi, S. H. E. Kaufmann (1994). Studies with MHC-deficient knockout mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **153**: 3116-3122
180. Kägi, D., B. Ledermann, K. Bürki, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel (1994). CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **24**: 3068-3072
181. Jensen, E. R., A. A. Glass, W. R. Clark, E. J. Wing, J. F. Miller, S. H. Gregory (1998). Fas (CD95)-dependent cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **66**: 4143-4150
182. Unanue, E. R. (1997). Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol. Rev.* **158**: 11-25
183. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, M. Aguet (1993). Immune responses in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. *Science*. **259**: 1742-1745
184. Harty, J. T., M. J. Bevan (1995). Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN $\gamma$ . *Immunity*. **3**: 109-117
185. Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, H. Bluethmann (1993). Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated cytotoxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. **364**: 798-802
186. Garcia, I., Y. Miyazaki, K. Araki, M. Araki, R. Lucas, G. E. Grau, G. Milon, Y. Belkaid, C. Montixi, W. Lesslauer, P. Vassalli (1995). Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2401-2407
187. Harty, J. T., M. J. Bevan (1996). CD8 T-cell recognition of macrophages and hepatocytes results in immunity to *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **64**: 3632-3640
188. Tripp, C. S., O. Kanagawa, E. R. Unanue (1995). Secondary response to *Listeria* infection requires IFN- $\gamma$  but is partially independent of IL-12. *J. Immunol.* **155**: 3427-3432
189. Appleberg, R., A. G. Castro, M. T. Silvia (1994). Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. *Immunology*. **83**: 302-307

190. Czuprynski, C. J., J. F. Brown, R. D. Wagner, H. Steinberg (1994). Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. *Infect. Immun.* **62**: 5161-5163
191. Rakhmievich, A. L. (1995). Neutrophils are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Leukoc. Biol.* **57**: 827-831
192. Samsom, J. N., J. Langermans, H. Savelkoul, R. v. Furth (1995). Tumour necrosis factor, but not interferon-gamma, is essential for acquired resistance to *Listeria monocytogenes* during a secondary infection in mice. *Immunology.* **86**: 256-262
193. Harty, J. T., M. J. Bevan (1992). CD8<sup>+</sup> T cells specific for a single monomer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. *J. Exp. Med.* **175**: 1531-1538
194. Harty, J. T., E. G. Pamer (1995). CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **154**: 4642-4650
195. zur Lage, S., J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss, A. Darji (1998). Protective immunity against *Listeria monocytogenes* obtained by cytotoxic T cells specific for secretory Internalin-related protein A. *Immunobiol.* **199**: 608
196. Darji, A., D. Bruder, S. z. Lage, B. Gerstel, T. Chakraborty, J. Wehland, S. Weiss (1998). The role of the bacterial membrane protein ActA in immunity and protection against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **161**: 2414-2420
197. Darji, A., C. A. Guzman, B. Gerstel, P. Wachholz, K. N. Timmis, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss (1997). Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell.* **91**: 765-775
198. Shen, H., J. F. Miller, X. Fan, D. Kolwyck, R. Ahmed, J. T. Harty (1998). Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity. *Cell.* **92**: 535-545
199. Hess, J., I. Gentshev, D. Miko, M. Welzel, C. Ladel, W. Goebel, S. H. E. Kaufmann (1996). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **93**: 1458-1463
200. Shen, H., C. M. Tato, X. Fan (1998). *Listeria monocytogenes* as a probe to study cell-mediated immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 450-458
201. Lenz, L. L., M. J. Bevan (1997). CTL responses to H2-M3-restricted Listeria epitopes. *Immunol. Rev.* **158**: 115-121
202. Nataraj, C., M. L. Brown, R. M. Poston, S. M. Shawar, R. R. Rich, K. Fischer-Lindahl, R. J. Kurlander (1996). H2-M3<sup>wt</sup>-restricted, *Listeria monocytogenes*-specific CD8 T cells recognize a novel, hydrophobic, protease-resistant, periodate-sensitive antigen. *Int. Immunol.* **8**: 367-378
203. Lenz, L. L., B. Dere, M. J. Bevan (1996). Identification of an H2-M3-restricted Listeria epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity.* **5**: 63-72
204. Gulden, P. H., P. F. III, N. E. Sherman, W. Wang, V. H. Engelhard, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E. G. Pamer (1996). A *Listeria monocytogenes* pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity.* **5**: 73-79



205. Kurlander, R., C. Nataraj (1997). Characterization of the murine H2-M3wt-restricted CD8 response against a hydrophobic, protease-resistant, phospholipid-associated antigen from *Listeria monocytogenes*. *Immunol. Rev.* **158**: 123-128
206. Mielke, M. E., C. Peters, H. Hahn (1997). Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol. Rev.* **158**: 79-93
207. Ehlers, S., M. E. A. Mielke, H. Hahn (1994). CD4<sup>+</sup> T cell associated cytokine gene expression during experimental infection with *Listeria monocytogenes*: the mRNA phenotype of granuloma formation. *Int. Immunol.* **6**: 1727-1737
208. Kaufmann, S. H. E., E. Hug, U. Vöth, G. DeLibero (1987). Specific lysis of *Listeria monocytogenes* infected macrophages by class II-restricted L3T4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* **17**: 237-246
209. Geginat, G., M. Lalic, M. Kretschmar, W. Goebel, H. Hof, D. Palm, A. Bubert (1998). Th1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*. *J. Immunol.* **160**: 6046-6055
210. Harty, J. T., R. D. Schreiber, M. J. Bevan (1992). CD8 T cells can protect against an intracellular bacterium in an interferon- $\gamma$ -independent fashion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**: 11612-11616
211. Brocke, S., H. Hahn (1991). Heat-killed *Listeria monocytogenes* soluble antigen induces clonable CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with protective and chemotactic activities *in vivo*. *Infect. Immun.* **59**: 4531-4539
212. Czuprynski, C. J., J. F. Brown (1987). Dual regulation of anti-bacterial resistance and inflammatory neutrophil and macrophage accumulation by L3T4<sup>+</sup> and Lyt2<sup>+</sup> *Listeria* immune T cells. *Immunology.* **60**: 287-293
213. Rakhmilevich, A. L. (1994). Evidence for a significant role of CD4<sup>+</sup> T cells in adoptive immunity to *Listeria monocytogenes* in the liver. *Immunology.* **82**: 249-54
214. Skeen, M. J., H. K. Ziegler (1993). Induction of murine peritoneal  $\gamma/\delta$  T cells and their role in resistance to bacterial infection. *J. Exp. Med.* **178**: 971-984
215. Ohga, S., Y. Yoshikai, Y. Takeda, K. Hiromatsu, K. Nomoto (1990). Sequential appearance of  $\gamma/\delta$ - and  $\alpha/\beta$ -bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* **20**: 533-538
216. Yamamoto, S., F. Russ, H. C. Teixeira, P. Conradt, S. H. E. Kaufmann (1993). *Listeria monocytogenes*-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial  $\gamma/\delta$  T lymphocytes. *Infect. Immun.* **61**: 2154-2161
217. Fu, Y. X., C. A. Roark, K. Kelly, D. Drevets, P. Campbell, R. O. Brien, W. Born (1994). Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by  $\gamma/\delta$  T cells. *J. Immunol.* **153**: 3101-3115
218. Miki, K., G. B. Mackaness (1964). The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **120**: 93-103
219. Spriggs, M. K. (1996). One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 101-30
220. Flamme, A. C. L., S. J. Kahn, A. Y. Rudenski, W. C. V. Voorhis (1997). *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3085-3094

221. Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, C. Montecucco (1998). Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* **187**: 135-140
222. Cluff, C. W., H. K. Ziegler (1987). Inhibition of macrophage-mediated antigen presentation by hemolysin-producing *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **139**: 3808-3812
223. Cluff, C. W., M. Garcia, H. K. Ziegler (1990). Intracellular hemolysin-producing *Listeria monocytogenes* strains inhibit macrophage-mediated antigen-processing. *Infect. Immun.* **58**: 3601-3612
224. Darji, A., B. Stockinger, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss (1997). T-cell anergy induced by antigen presenting cells treated with the hemolysin of *Listeria monocytogenes*. *Immunol. Letters.* **57**: 33-37
225. Darji, A., B. Stockinger, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss (1997). Antigen-specific T cell receptor antagonism by antigen-presenting cells treated with the hemolysin of *Listeria monocytogenes*: a novel type of immune escape. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1696-1703
226. Darji, A., S. z. Lage, D. Bruder, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss (1998). Evidence for the involvement of different cellular compartments in the generation of different T cell epitopes. *Immunobiol.* **199**: 421
227. Gholizadeh, Y., C. Poyart, M. Juvin, J. L. Beretti, J. Croize, P. Berche, J. L. Gaillard (1996). Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1391-1395
228. Gaillard, J.-L., J.-L. Beretti, M. Boulot-Tolle, J.-M. Wilhelm, J. L. Bertrand, T. Herbelleau, P. Berche (1992). Serological evidence for culture-negative listeriosis of central nervous system. *Lancet.* **340**: 560
229. Gentshev, I., Z. Sokolovic, S. Köhler, G. F. Krohne, H. Hof, J. Wagner, W. Goebel (1992). Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated *Salmonellae* by the HlyB-HlyD secretion system. *Infect. Immun.* **60**: 5091-5098
230. Berche, P., K. A. Reich, M. Bonnichon, J.-L. Beretti, C. Geoffroy, J. Raveneau, P. Cossart, J.-L. Gaillard, P. Geslin, H. Kreis, M. Veron (1990). Detection of anti-listeriolysin O for serodiagnosis of human listeriosis. *Lancet.* **335**: 624-627
231. Renneberg, J., K. Persson, P. Christensen (1990). Western blot analysis of the antibody response in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis and septicemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: 659-663
232. Fleming, S. D., P. A. Campbell (1997). Some macrophages kill *Listeria monocytogenes* while others do not. *Immunol. Rev.* **158**: 69-77
233. Kuhn, M., W. Goebel (1997). Responses by murine macrophages infected with *Listeria monocytogenes* crucial for the development of immunity to this pathogen. *Immunol. Rev.* **158**: 57-67
234. Weiskirch, L. M., Y. Paterson (1997). *Listeria monocytogenes*: a potent vaccine vector for neoplastic and infectious disease. *Immunol. Rev.* **158**: 159-169
235. Shen, H., M. K. Slifka, M. Matloubian, E. R. Jensen, R. Ahmed (1995). Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **92**: 3987-3991

236. Ikonomidis, G., Y. Paterson, F. J. Kos, D. A. Portnoy (1994). Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **180**: 2209-2218
237. Paterson, Y., G. Ikonomidis (1996). Recombinant *Listeria monocytogenes* cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 664-669
238. Jensen, E. R., H. Shen, F. O. Wettstein, R. Ahmed, J. F. Miller (1997). Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunol. Rev.* **158**: 147-157
239. Bruder, D., A. Darji, D. M. Gakamsky, T. Chakraborty, I. Pecht, J. Wehland, S. Weiss (1998). Efficient induction of cytolytic CD8<sup>+</sup> T cells against exogenous proteins: establishment and characterization of a T cell line specific for the membrane protein ActA of *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2630-2639
240. Darji, A., T. Chakraborty, J. Wehland, S. Weiss (1995). Listeriolysin generates a route for the presentation of exogenous antigens by major histocompatibility complex class I. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2967-2971
241. Darji, A., T. Chakraborty, J. Wehland, S. Weiss (1997). TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of soluble proteins using listeriolysin. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1353-1359
242. Lee, K. D., Y. K. Oh, D. A. Portnoy, J. A. Swanson (1996). Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* **271**: 7249-7252
243. Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed, 1-3: Cold Spring Harbour Laboratory Press
244. Darji, A., T. Chakraborty, K. Niebuhr, N. Tsonis, J. Wehland, S. Weiss (1995). Hyperexpression of listeriolysin in the nonpathogenic species *Listeria monocytogenes* and high yield purification. *J. Biotechnol.* **43**: 205-212
245. Lingnau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, T. Chakraborty (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue-culture cell-lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun.* **63**: 3896-3903
246. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
247. Heukeshoven, J., R. Dernick (1986). Vereinfachte und universelle MEthode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen: Bemerkung zum Mechanismus der Silberfärbung. *LKB-Applikationen Note RE-034*
248. Guzmán, C. A., M. Rohde, T. Chakraborty, E. Domann, M. Hudel, J. Wehland, K. N. Timmis (1995). Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* **63**: 3665-3673
249. Leimeister-Wächter, M., C. Haffner, E. Domann, W. Goebel, T. Chakraborty (1990). Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 8336-8340

250. Kaufmann, S. H. E. (1984). Acquired resistance to facultative intracellular bacteria: relationship between persistence, cross-reactivity at the T cell level, and capacity to stimulate cellular immunity of different *Listeria* strains. *Infect. Immun.* **45**: 234-241
251. Parida, S. K., E. Domann, M. Rohde, S. Müller, A. Darji, T. Hain, J. Wehland, T. Chakraborty (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **28**: 81-93
252. Matzinger, P. (1991). The JAM test  
A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J. Immunol. Methods.* **145**: 185-192
253. Sharrock, C. E., E. Kaminski, S. Man (1990). Limiting dilution analysis of human T cells: a useful clinical tool [see comments]. *Immunol. Today.* **11**: 281-6
254. Grenningloh, R., A. Darji, S. z. Lage, T. Jacobs, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss Induction of a protective CD8<sup>+</sup> T cell response against *Listeria monocytogenes* with antigen encapsulated in pH-sensitive liposomes. *manuscript in preparation*
255. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**: 389-400
256. Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature.* **314**: 537-539
257. Bouwer, H. G., A. Bai, J. Forman, S. H. Gregory, E. J. Wing, R. A. Barry, D. J. Hinrichs (1998). *Listeria monocytogenes*-infected hepatocytes are targets of major histocompatibility complex class Ib-restricted antilisterial cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun.* **66**: 2814-7
258. Cerny, A., A. W. Hügin, H. Bazin, S. Sutter, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel (1988). Anti-*Listeria monocytogenes* immunity in  $\mu$ -suppressed mice: a comparison of treatment with conventional hyperimmune rabbit anti-mouse IgM and affinity-purified, monoclonal rat anti-mouse IgM. *Med. Microbiol. Immunol.* **177**: 123-131
259. Schmidt-Wolf, G., H. P. R. Seeliger, A. Schrettenbrunner (1987). Menschliche Listeriose-Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland, 1969-85. *Zbl. Bakt. Hyg. A*: 472-486
260. Kampelmacher, E. H., L. M. Noorle Jansen v. (1972). Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A*: 70-77
261. Schuller, S., S. Kugler, W. Goebel (1998). Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20**: 289-299
262. Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, R. Ahmed (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* **188**: 2205-13
263. Kalams, S. A., B. D. Walker (1998). The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **188**: 2199-204
264. Hage-Chahine, C. M., G. d. Giudice, P.-H. Lambert, J.-C. Pechere (1992). Hemolysin-producing *Listeria monocytogenes* affects the immune response to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens. *Infect. Immun.* **60**: 1415-1421